Nº d'Ordre

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ SCIENTIFIQUE ET MÉDICALE DE GRENOBLE

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR DE 3me CYCLE
DE CHIMIE ORGANIQUE ET BIOLOGIQUE

par

Christian BERT

EFFET DES RAYONS GAMMA SUR L'ADN D'*ESCHERICHIA COLI* EN SOLUTION AQUEUSE ETUDE DES MODIFICATIONS DE LA BASE THYMINE

Soutenue le 19 décembre 1974, devant la Commission d'Examen

JURY

MM. Les Professeurs G. CAUQUIS *Président*

C. HELENE
J. PELMONT } *Examinateurs*
M. R. TEOULE

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

J'exprime à Monsieur le Professeur CAUQUIS, de l'Université Scientifique et Médicale de Grenoble, Chef du Laboratoire d'Electrochimie Organique Analytique du Département de Recherche Fondamentale du Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, ma plus vive reconnaissance pour avoir bien voulu présider le Jury d'examen de cette thèse.

Monsieur HELENE, Directeur du Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans, me fait l'honneur de se déplacer pour juger ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères et très respectueux remerciements.

Mes remerciements iront également à Monsieur PELMONT, Professeur à l'Université Scientifique et Médicale de Grenoble, pour avoir accepté de faire partie de mon Jury.

Cette thèse, préparée dans le Laboratoire de Radiobiologie du Département de Recherche Fondamentale du Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, est pour moi l'occasion de présenter à Monsieur TEOULE l'assurance de ma profonde gratitude. Pendant les deux années passées dans le Laboratoire qu'il dirige, il m'a fait bénéficier de son expérience et de ses conseils ; il a dirigé et orienté ces recherches avec un soin particulier.

J'associe dans mes remerciements Monsieur BONICEL, Ingénieur au Laboratoire de Radiobiologie, pour les encouragements et les conseils qu'il n'a jamais manqué de me prodiguer.

Ma sincère reconnaissance est également acquise à Madame FOUQUE, Messieurs GAUCI et DALDAL. Leur collaboration passagère mais non moins efficace et sympathique m'a été précieuse.

Je remercie vivement tous les services aénéraux du Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble qui, à des titres divers m'ont apporté leur concours pour mener à terme ce travail.

Enfin, je n'oublierai pas d'exprimer mes remerciements à tous mes collègues de laboratoire, et plus particulièrement à Messieurs CADET et POLVERELLI, pour la sympathie dont ils m'ont entouré et les conseils toujours judicieux que j'ai trouvés auprès d'eux pendant ces deux années.

UNIVERSITE SCIENTIFIQUE ET MEDICALE DE GRENOBLE		INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE GRENOBLE
M. Michel SOUTIF	Présidents	M. Louis NEEL
M. Gabriel CAU	Vice-Présidents	MM. Lucien BONNETAIN
		Jean BENOIT

MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT DE L'U.S.M.G.

PROFESSEURS TITULAIRES

MM.	ANGLES D'AURIAC Paul	Mécanique des fluides
	ARNAUD Georges	Clinique des maladies infectieuses
	ARNAUD Paul	Chimie
	AUBERT Guy	Physique
	AYANT Yves	Physique approfondie
Mme	BARBIER Marie-Jeanne	Electrochimie
MM.	BARBIER Jean-Claude	Physique expérimentale
	BARBIER Reynold	Géologie appliquée
	BARJON Robert	Physique nucléaire
	BARNOUD Fernand	Biosynthèse de la cellulose
	BARRA Jean-René	Statistiques
	BARRIE Joseph	Clinique chirurgicale
	BEAUDOING André	Pédiatrie
	BERNARD Alain	Mathématiques Pures
Mme	BERTRANDIAS Françoise	Mathématiques Pures
MM.	BEZES Henri	Chirurgie générale
	BLAMBERT Maurice	Mathématiques Pures
	BOLLIET Louis	Informatique (IUT B)
	BONNET Georges	Electrotechnique
	BONNET Jean-Louis	Clinique ophtalmologique
	BONNET-EYMARD Joseph	Pathologie médicale
	BOUCHERLE André	Chimie et Toxicologie
	BOUCHEZ Robert	Physique nucléaire
	BOUSSARD Jean-Claude	Mathématiques Appliquées
	BRAVARD Yves	Géographie
	CABANEL Guy	Clinique rhumatologique et hydrologie
	CALAS François	Anatomie
	CARRAZ Gilbert	Biologie animale et pharmacodynamie
	CAU Gabriel	Médecine légale et Toxicologie
	CAUQUIS Georges	Chimie organique
	CHABAUTY Claude	Mathématiques Pures
	CHARACHON Robert	Oto-Rhino-Laryngologie
	CHATEAU Robert	Thérapeutique
	CHIBON Pierre	Biologie animale
	COEUR André	Pharmacie chimique et chimie analytique
	CONTAMIN Robert	Clinique gynécologique
	COUDERC Pierre	Anatomie Pathologique
	CRAYA Antoine	Mécanique
Mme	DEBELMAS Anne-Marie	Matière médicale
MM.	DEBELMAS Jacques	Géologie générale
	DEGRANGE Charles	Zoologie
	DEPORTES Charles	Chimie minérale
	DESRE Pierre	Métallurgie
	DESSAUX Georges	Physiologie animale
	DODU Jacques	Mécanique appliquée
	DOLIQUE Jean-Michel	Physique des plasmas
	DREYFUS Bernard	Thermodynamique
	DUCROS Pierre	Cristallographie
	DUGOIS Pierre	Clinique de Dermatologie et Syphiligraphie
	FAU René	Clinique neuro-psychiatrique

MM.	GAGNAIRE Didier	Chimie physique
	GALLISSOT François	Mathématiques Pures
	GALVANI Octave	Mathématiques Pures
	GASTINEL Noël	Analyse numérique
	GAVEND Michel	Pharmacologie
	GEINDRE Michel	Electroradiologie
	GERBER Robert	Mathématiques Pures
	GERMAIN Jean-Pierre	Mécanique
	GIRAUD Pierre	Géologie
	KAHANE André	Physique générale
	KLEIN Joseph	Mathématiques Pures
	KOSZUL Jean-Louis	Mathématiques Pures
	KRAVTCHENKO Julien	Mécanique
	KUNTZMANN Jean	Mathématiques Appliquées
	LACAZE Albert	Thermodynamique
	LACHARME Jean	Biologie végétale
	LAJZEROWICZ Joseph	Physique
	LATREILLE René	Chirurgie générale
	LATURAZE Jean	Biochimie pharmaceutique
	LAURENT Pierre	Mathématiques Appliquées
	LEDRU Jean	Clinique médicale B
	LLIBOUTRY Louis	Géophysique
	LONGEQUEUE Jean-Pierre	Physique nucléaire
	LOUP Jean	Géographie
Mle	LUTZ Elisabeth	Mathématiques Pures
	MALGRANGE Bernard	Mathématiques Pures
	MALINAS Yves	Clinique obstétricale
	MARTIN-NOEL Pierre	Seméiologie médicale
	MAZARE Yves	Clinique médicale A
	MICHEL Robert	Minéralogie et Pétrographie
	MOURIQUAND Claude	Histologie
	MOUSSA André	Chimie nucléaire
	NEEL Louis	Physique du Solide
	OZENDA Paul	Botanique
	PAYAN Jean-Jacques	Mathématiques Pures
	PEBAY-PEYROULA Jean-Claude	Physique
	RASSAT André	Chimie systématique
	RENARD Michel	Thermodynamique
	REULOS René	Physique industrielle
	RINALDI Renaud	Physique
	ROGET Jean	Clinique de pédiatrie et de puériculture
	DE ROUGEMONT Jacques	Neuro-chirurgie
	SEIGNEURIN Raymond	Microbiologie et Hygiène
	SENGEL Philippe	Zoologie
	SOUTIF Michel	Physique générale
	TANCHE Maurice	Physiologie
	TRAYNARD Philippe	Chimie générale
	VAILLANT François	Zoologie
	VALENTIN Jacques	Physique Nucléaire
	VAUQUOIS Bernard	Calcul électronique
Mme	VERAIN Alice	Pharmacie galénique
M.	VERAIN André	Physique
MM.	VEYRET Paul	Géographie
	VIGNAIS Pierre	Biochimie médicale
	YOCCOZ Jean	Physique nucléaire théorique

PROFESSEURS ASSOCIES

MM.	ASCARELLI Gianni	Physique
	CHEEKE John	Thermodynamique
	GILLESPIE John	I.S.N.
	ROCKAFELLAR Ralph	Mathématiques appliquées
	WOHLFARTH Erich	Physique du solide

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544305_0031

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Mle	AGNIUS-DELORD Claudine	Physique pharmaceutique
	ALARY Josette	Chimie analytique
MM.	BELORIZKY Elie	Physique
	BENZAKEN Claude	Mathématiques appliquées
	BERTRANDIAS Jean-Paul	Mathématiques appliquées
	BIAREZ Jean-Pierre	Mécanique
Mme	BONNIER Jane	Chimie générale
MM.	BRUGEL Lucien	Energétique
	CARLIER Georges	Biologie végétale
	CONTE René	Physique
	DEPASSEL Roger	Mécanique des Fluides
	GAUTHIER Yves	Sciences biologiques
	GAUTRON René	Chimie
	GIDON Paul	Géologie et Minéralogie
	GLENAT René	Chimie organique
	HACQUES Gérard	Calcul numérique
	HOLLARD Daniel	Hématologie
	HUGONOT Robert	Hygiène et Méd.Préventive
	IDELMAN Simon	Physiologie animale
	JANIN Bernard	Géographie
	JOLY Jean-René	Mathématiques pures
	JULLIEN Pierre	Mathématiques appliquées
Mme	KAHANE Josette	Physique
MM.	KUHN Gérard	Physique
	LUU-DUC-Cuong	Chimie Organique
	MAYNARD Roger	Physique du solide
	MULLER Jean-Michel	Thérapeutique
	PERRIAUX Jean-Jacques	Géologie et minéralogie
	PFISTER Jean-Claude	Physique du solide
Mle	PIERY Yvette	Physiologie animale
MM.	REBECQ Jacques	Biologie (CUS)
	REVOL Michel	Urologie
	REYMOND Jean-Charles	Chirurgie générale
	ROBERT André	Chimie papetière
	SARRAZIN Roger	Anatomie et chirurgie
	SARROT-REYNAULD Jean	Géologie
	SIBILLE Robert	Construction Mécanique
	SIROT Louis	Chirurgie générale
Mme	SOUTIF Jeanne	Physique générale
MM.	VIALON Pierre	Géologie
	VAN CUTSEM Bernard	Mathématiques appliquées

MAITRES DE CONFERENCES ET MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM.	AMBLARD Pierre	Dermatologie
	AMBROISE-THOMAS Pierre	Parasitologie
	ARMAND Yves	Chimie
	BEGUIN Claude	Chimie organique
Mme	BERIEL Héléne	Pharmacodynamique
M.	BILLET Jean	Géographie
	BOUCHARLAT Jacques	Psychiatrie adultes
Mme	BOUCHE Liane	Mathématiques (CUS)
MM.	BOUCHET Yves	Anatomie
	BRODEAU François	Mathématiques (IUT B)
	BUISSON Roger	Physique
	BUTEL Jean	Orthopédie
	CHAMBAZ Edmond	Biochimie médicale
	CHAMPETIER Jean	Anatomie et organogénèse
	CHERADAME Hervé	Chimie papetière
	CHIAVERINA Jean	Biologie appliquée (EFP)

MM.	COHEN-ADDAD Jean-Pierre	Spectrométrie physique
	COLOMB Maurice	Biochimie médicale
	COULOMB Max	Radiologie
	CROUZET Guy	Radiologie
	CYROT Michel	Physique du solide
	DELOBEL Claude	M.I.A.G.
	DUSSAUD René	Mathématiques (CUS)
Mme	ETERRADOSSI Jacqueline	Physiologie
MM.	FAURE Jacques	Médecine légale
	FONTAINE Jean-Marc	Mathématiques Pures
	GENSAC Pierre	Botanique
	GIDON Maurice	Géologie
	GRIFFITHS Michaël	Mathématiques Appliquées
	GROS Yves	Physique (stag.)
	GROULADE Joseph	Biochimie médicale
	GUITTON Jacques	Chimie
	IVANES Marcel	Electricité
	JALBERT Pierre	Histologie
	KRAKOWIAK Sacha	Mathématiques appliquées
Mme	LAJZEROWICZ Jeannine	Physique
MM.	LEROY Philippe	Mathématiques
	LOISEAUX Jean-Marie	Physique Nucléaire
	MACHE Régis	Physiologie végétale
	MAGNIN Robert	Hygiène et Médecine préventive
	MARECHAL Jean	Mécanique
	MARTIN-BOUYER Michel	Chimie (CUS)
	MICHOULIER Jean	Physique (I.U.T. "A")
Mme	MINIER Colette	Physique
MM.	MICOUD Max	Maladies infectieuses
	NEGRE Robert	Mécanique
	PARAMELLE Bernard	Pneumologie
	PECCOUD François	Analyse (IUT B)
	PEFFEN René	Métallurgie
	PELMONT Jean	Physiologie animale
	PERRET Jean	Neurologie
	PHELIP Xavier	Rhumatologie
	RACHAIL Michel	Médecine interne
	RACINET Claude	Gynécologie et obstétrique
	RAYNAUD Hervé	M.I.A.G.
	RENAUD Maurice	Chimie
Mme	RENAUDET Jacqueline	Bactériologie
M.	RICHARD Lucien	Botanique
Mme	RINAUDO Marguerite	Chimie macromoléculaire
MM.	ROMIER Guy	Mathématiques (IUT B)
	SHOM Jean Claude	Chimie Générale
	STIEGLITZ Paul	Anesthésiologie
	STOEBNER Pierre	Anatomie pathologique
	VROUSOS Constantin	Radiologie

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

MM.	CRABBEE Pierre	C.E.R.M.O.
	CABOT	Mathématiques appliquées
	CURRIE Jan	Mathématiques appliquées

CHARGES DE FONCTIONS DE MAITRES DE CONFERENCES

MM.	BARGE Michel	Neuro-chirurgie
	CONTAMIN Charles	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
	CORDONNIER Daniel	Néphrologie
	DENIS Bernard	Cardiologie
	KOLODIE Lucien	Hématologie
	RAMBAUD Pierre	Pédiatrie
	ROCHAT Jacques	Hygiène et hydrologie

MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT DE L'I.N.P.G.

PROFESSEURS TITULAIRES

MM.	BENOIT Jean	Radioélectricité
	BESSON Jean	Electrochimie
	BONNETAIN Lucien	Chimie Minérale
	BONNIER Etienne	Electrochimie, Electrométallurgie
	BRISSONNEAU Pierre	Physique du solide
	BUYLE-BODIN Maurice	Electronique
	COUMES André	Radioélectricité
	FELICI Noël	Electrostatique
	PAUTHENET René	Physique du solide
	PERRET René	Servomécanismes
	SANTON Lucien	Mécanique
	SILBER Robert	Mécanique des Fluides

PROFESSEUR ASSOCIE

M.	BOUDOURIS Georges	Radioélectricite

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.	BLIMAN Samuel	Electronique
	BLOCH Daniel	Physique du solide et Cristallographie
	COHEN Joseph	Electrotechnique
	DURAND Francis	Métallurgie
	MOREAU René	Mécanique
	POLOUJADOFF Michel	Electrotechnique
	VEILLON Gérard	Informatique fondamentale et appliquée
	ZADWORNY François	Electronique

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	BOUVARD Maurice	Génie mécanique
	CHARTIER Germain	Electronique
	FOULARD Claude	Automatique
	GUYOT Pierre	Chimie minérale
	JOUBERT Jean Claude	Physique du solide
	LACOUME Jean Louis	Géophysique
	LANCIA Roland	Physique atomique
	LESPINARD Georges	Mécanique
	MORET Roger	Electrotechnique nucléaire
	ROBERT François	Analyse numérique
	SABONNADIERE Jean Claude	Informatique fondamentale et appliquée
Mme	SAUCIER Gabrièle	Informatique fondamentale et appliquée

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

M.	LANDAU Ioan Doré	Automatique

CHARGE DE FONCTIONS DE MAITRES DE CONFERENCES

M.	ANCEAU François	Mathématiques appliquées

Fait à St Martin d'Hères JANVIER 1974

PLAN

	Pages
CHAPITRE I. RADIOBIOLOGIE DES ACIDES NUCLEIQUES	1
I.1. Historique - Généralités	1
I.2. L'ADN en radiobiologie	2
I.2.1. Rappels sur la structure de l'ADN	2
I.2.2. L'ADN, molécule cible	5
I.3. Absorption d'énergie par la matière	5
I.3.1. Radiations ionisantes et nons ionisantes	5
I.3.2. Interactions entre énergie et matière	5
I.3.2.1. Photon-matière	6
I.3.2.2. Electron-matière	6
I.3.3. Action du rayonnement sur la matière vivante	7
I.4. Action du rayonnement UV	7
I.4.1. Généralités	7
I.4.2. Action sur les pyrimidines	8
I.4.2.1. Dimérisation	8
I.4.2.2. Hydratation	8
I.4.2.3. Comparaison hydrate/dimère	9
I.4.2.4. Autres lésions	9
I.4.2.4.1. Pontage pyrimidine-acide aminé	9
I.4.2.4.2. Dimères particuliers	10
I.4.3. Action sur les purines	10
I.4.4. Cassures de chaînes	11
I.5. Action des rayonnements ionisants	11
I.5.1. Généralités	11
I.5.2. Effets direct et indirect	11
I.5.3. Radiolyse de l'eau	12
I.5.4. Lésions produites	13
I.5.4.1. Dégradation de l'ADN	13
I.5.4.2. Simples cassures	13
I.5.4.3. Doubles cassures	14
I.5.4.4. "Cross-links"	15
I.5.4.5. Aperçu des modifications chimiques	15
I.5.4.5.1. Au niveau de la base radiolyse de la thymine	15
I.5.4.5.2. Au niveau du nucléoside : radiolyse de la thymidine	16
I.5.4.5.3. Au niveau du fragment thymidylique de l'ADN (in vivo et in vitro)	18
I.5.5. Inactivation biologique	22
I.6. Réparation	22
I.6.1. Introduction	22
I.6.1.1. Historique	23
I.6.1.2. Généralités	23
I.6.2. Description des mécanismes	23
I.6.2.1. Photorestauration	24
I.6.2.2. Réparation par excision	24
I.6.2.3. Réparation par recombinaison	27
I.6.3. Conclusion	29
CHAPITRE II. PARTIE EXPERIMENTALE : MATERIELS ET METHODES	30
II.1. Obtention d'ADN marqué	30
II.1.1. Généralités	30
II.1.2. Technique de culture. Contrôle de l'auxotrophie	30
II.1.3. Extraction de l'ADN	31
II.1.4. Conservation de l'ADN	33
II.1.5. Contrôle de la nativité de l'ADN	33
II.2. Irradiation de l'ADN	33
II.2.1. Traitement avant irradiation	33
II.2.2. Conditions d'irradiation	34
II.2.2.1. Généralités	34
II.2.2.2. Irradiation en milieu aéré	34

Pages

II.2.2.3. Irradiation en milieu désaéré 35
II.2.2.4. Etudes cinétiques 35
II.2.2.5. Etude de l'effet de dilution 35
II.2.2.6. Etude de l'effet de sel 36
II.2.3. Traitement après irradiation- Discussion 36
II.3. Hydrolyse de la chaîne 39
II.3.1. Hydrolyse acide 39
II.3.1.1. Matériel 39
II.3.1.2. Méthode 40
II.3.1.3. Discussion 41
II.3.2. Hydrolyse enzymatique 42
II.3.2.1. Généralités 42
II.3.2.2. Préparation de l'ADN 42
II.3.2.3. Préparation de l'extrait enzymatique 42
II.3.2.4. Hydrolyse proprement dite 43
II.3.2.5. Discussion 43
II.3.3. Etudes cinétiques 43
II.4. Séparation des produits de radiolyse 44
II.4.1. Chromatographie sur couche mince 44
II.4.1.1. Absorbants 44
II.4.1.2. Systèmes de solvants 45
II.4.2. Détection des produits 46
II.4.2.1. Introduction 46
II.4.2.2. Localisation par témoins chromatographiques 46
II.4.2.3. Détection des produits marqués au ^{14}C 47
II.4.2.4. Détection des produits témoins 47
II.4.3. Analyse quantitative 48
II.4.4. Purification des produits radioactifs commerciaux 48
II.5. Obtention des produits témoins 49
II.5.1. Produits commerciaux 49
II.5.2. Produits obtenus par synthèse 49
II.6. Caractérisation des produits de radiolyse 49
II.6.1. Généralités 49
II.6.2. Produits communs aux milieux aéré et désaéré 50
II.6.2.1. Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis* 50
II.6.2.2. Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *trans* 50
II.6.2.3. Acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique 50
II.6.2.4. Hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne 51
II.6.3. Produits spécifiques des conditions aérées 51
II.6.3.1. Pyruvamide 51
II.6.3.2. Formyl-N Pyruvyl-N' urée 52
II.6.4. Produits spécifiques des conditions désaérées 52
II.6.4.1. Dihydro-5,6 thymine 52
II.6.4.2. Hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine 52
II.6.4.3. Hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine *cis* et *trans* 53

1ère PARTIE. PRODUITS DE COUPURE 54

<u>CHAPITRE III. RADIOLYSE DE L'ADN EN SOLUTION AQUEUSE AEREE</u> 55

III.1. Produits de Radiolyse 55
III.2. Identification et caractérisation des produits radioformés 55
III.2.1. Difficultés rencontrées 55
III.2.2. Thymine 58
III.2.3. Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis* 58
III.2.4. Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *trans* 60
III.2.5. Acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique 61
III.2.6. Hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne 62
III.2.7. Pyruvamide 63

Pages

III.2.8. Formyl-N Pyruvyl-N' urée 63
III.2.9. Formylurée 64
III.2.10. Acétylurée 64
III.3. Etude cinétique 65
III.4. Discussion 65

CHAPITRE IV. RADIOLYSE DE L'ADN EN SOLUTION AQUEUSE DESAEREE 73
IV.1. Introduction 73
IV.2. Identification et caractérisation des produits radioformés 75
IV.2.1. Généralités 75
IV.2.2. Thymine 75
IV.2.3. Dihydro-5,6 thymine 75
IV.2.4. Hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine 76
IV.2.5. Hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine cis et trans 76
IV.2.6. Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine cis et trans 77
IV.2.7. Acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique 78
IV.2.8. Hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne 78
IV.3. Etude cinétique 78
IV.4. Discussion 80

CHAPITRE V. MECANISMES DE LIBERATION DE LA THYMINE 84

2ème PARTIE. PRODUITS DE LA CHAINE 92

INTRODUCTION 93

CHAPITRE VI. HYDROLYSE DE L'ADN IRRADIE EN SOLUTION AQUEUSE AEREE 94

VI.1. Etude des conditions optimales d'hydrolyse acide 94
VI.1.1. Nature de l'acide 94
VI.1.2. L'acide formique 95
VI.1.2.1. Influence de la température 95
VI.1.2.2. Influence de l'acidité 95
VI.1.2.3. Influence de la durée 95
VI.2. Produits libérés par l'hydrolyse : étude qualitative 96
VI.2.1. Produits de radiolyse 99
VI.2.1.1. Thymine 99
VI.2.1.2. Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine cis 99
VI.2.1.3. Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine trans 99
VI.2.1.4. Acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique et hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne 101
VI.2.1.5. Formylurée 101
VI.2.2. Produits secondaires dûs à l'hydrolyse 102
VI.3. Essai d'analyse quantitative des produits de la chaîne 105
VI.3.1. Dosage des dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine 105
VI.3.2. Dosage de l'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne et de l'acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique 106
VI.3.3. Etude de l'effet de la dilution 106
VI.3.4. Etude de l'effet de sel 106
VI.4. Discussion 108
VI.4.1. Critique de la méthode 108
VI.4.2. Discussion des résultats 111

CHAPITRE VII. HYDROLYSE DE L'ADN IRRADIE EN SOLUTION AQUEUSE DESAEREE 114

VII.1. Etude des conditions optimales d'hydrolyse 114
VII.1.1. L'acide chlorhydrique 114
VII.1.2. L'acide formique 115
VII.1.2.1. Conditions d'acidité 115
VII.1.2.2. Influence de la durée et de la température 115
VII.1.3. Hydrolyse enzymatique 116
VII.2. Produits libérés par hydrolyse acide : étude qualitative 117
VII.2.1. Produits de radiolyse 117

Pages

VII.2.1.1. Thymine 119

VII.2.1.2. Dihydro-5,6 thymine 119

VII.2.1.3. Hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine 119

VII.2.1.4. Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine cis et trans 119

VII.2.1.5. Autres produits 120

VII.2.2. Produits secondaires 120

VII.3. Produits libérés par hydrolyse enzymatique : etude qualitative 120

VII.3.1. Thymine 120

VII.3.2. Dihydro-5,6 thymine 120

VII.3.3. Hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine 120

VII.3.4. Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine cis et trans 122

VII.3.5. Hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine 122

VII.3.6. Thymidine 122

VII.4. Discussion 123

VII.4.1. Critique des méthodes 123

VII.4.2. Discussion des résultats 125

CONCLUSIONS GENERALES 127

BIBLIOGRAPHIE 130

CHAPITRE I

RADIOBIOLOGIE DES ACIDES NUCLEIQUES

I.1 - HISTORIQUE - GENERALITES

Dès la découverte des rayons X par ROENTGEN en 1895 et du radium par Marie CURIE en 1898, les lésions biologiques provoquées par le rayonnement X ou celui émis par le radium furent constatés. Quelques mois après les observations de ROENTGEN, un physicien manipulant des tubes à rayons X fut frappé d'une radiodermite. De même, Pierre CURIE fut atteint d'une affection de la peau après avoir porté sur le bras pendant plusieurs heures un échantillon de radium dans le but de vérifier l'action nocive du rayonnement émis par ce métal.

Très vite on s'aperçut de la possibilité de cancérisation de telles lésions. En 1902, on signale un cancer dû au rayonnement chez un manipulateur de tubes à rayons X.

Dès lors, l'action destructrice et éventuellement cancérigène des radiations commence à être étudiée : quelques biologistes entreprennent de soumettre de petits animaux à l'action des rayonnements. On peut considérer que la radiobiologie effectue alors ses premiers pas. Les premières lois de l'action de l'irradiation sur les tissus de mammifères seront bientôt énoncées :

- tous les tissus ne présentent pas une sensibilité égale à l'action d'une dose donnée de rayonnement.
- cette radiosensibilité est liée aux cellules qui composent le tissu.
- plus les cellules ont une croissance rapide, plus elles sont radiosensibles.
- dans toute cellule, la partie la plus radiosensible est celle qui constitue le patrimoine héréditaire de celle-ci.

Ces lois peuvent être étendues à tous les organismes vivants, y compris les microorganismes.

I.2 - L'ADN EN RADIOBIOLOGIE.

Ce patrimoine héréditaire dont il est question précédemment, quel est-il ? Il s'agit des acides nucléiques :

- acide desoxyribonucléique ou A.D.N. pour la plupart des organismes biologiques. Il est le constituant essentiel des chromosomes ; sa structure sera brièvement rappelée *(vide infra)*.
- acide rubonucléique ou A.R.N. dans le cas de quelques virus seulement.

I.2.1 - Rappels sur la structure de l'ADN.

La connaissance de la structure détaillée de l'ADN résulte en grande partie des travaux des anglais WATSON et CRICK.

L'ADN est formé de deux chaînes polynucléotidiques enroulées l'une autour de l'autre en double hélice (fig. I-2). Chaque chaîne comprend une armature linéaire formée d'une succession ininterrompue de molécules de 2'-désoxyribose et d'acide phosphorique reliées entre elles par des liaisons phosphodiester 3'-5'. Chaque molécule de désoxyribose est liée à une base purique (adénine ou guanine) ou pyrimidique (thymine ou cytosine) par l'intermédiaire d'une liaison N-glycosidique (fig. I-1). Les bases sont tournées vers l'intérieur et liées entre elles par des liaisons hydrogène, ce qui assure la cohésion de l'ensemble. Les deux brins sont complémentaires car une adénine est toujours opposée à une thymine (appariement réalisé par deux liaisons H), et une cytosine est toujours opposée à une guanine (appariement réalisé par trois liaisons H). Il est à noter, que compte tenu de la polarité de la liaison phosphodiester, le brin d'ADN est orienté : 3'→5' ou 5'→3'. Deux brins complémentaires sont orientés en sens inverse.

Une molécule d'ADN est extrêmement longue et composée d'un nombre considérable de nucléotides, puisque les ADN ont un poids moléculaire de l'ordre de plusieurs dizaines ou centaines de millions (alors que le poids moléculaire moyen d'un nucléotide est environ 350).

C'est la succession précise, séquentielle des bases sur la chaîne qui représente l'ensemble des informations portées par l'ADN. Ces informations :

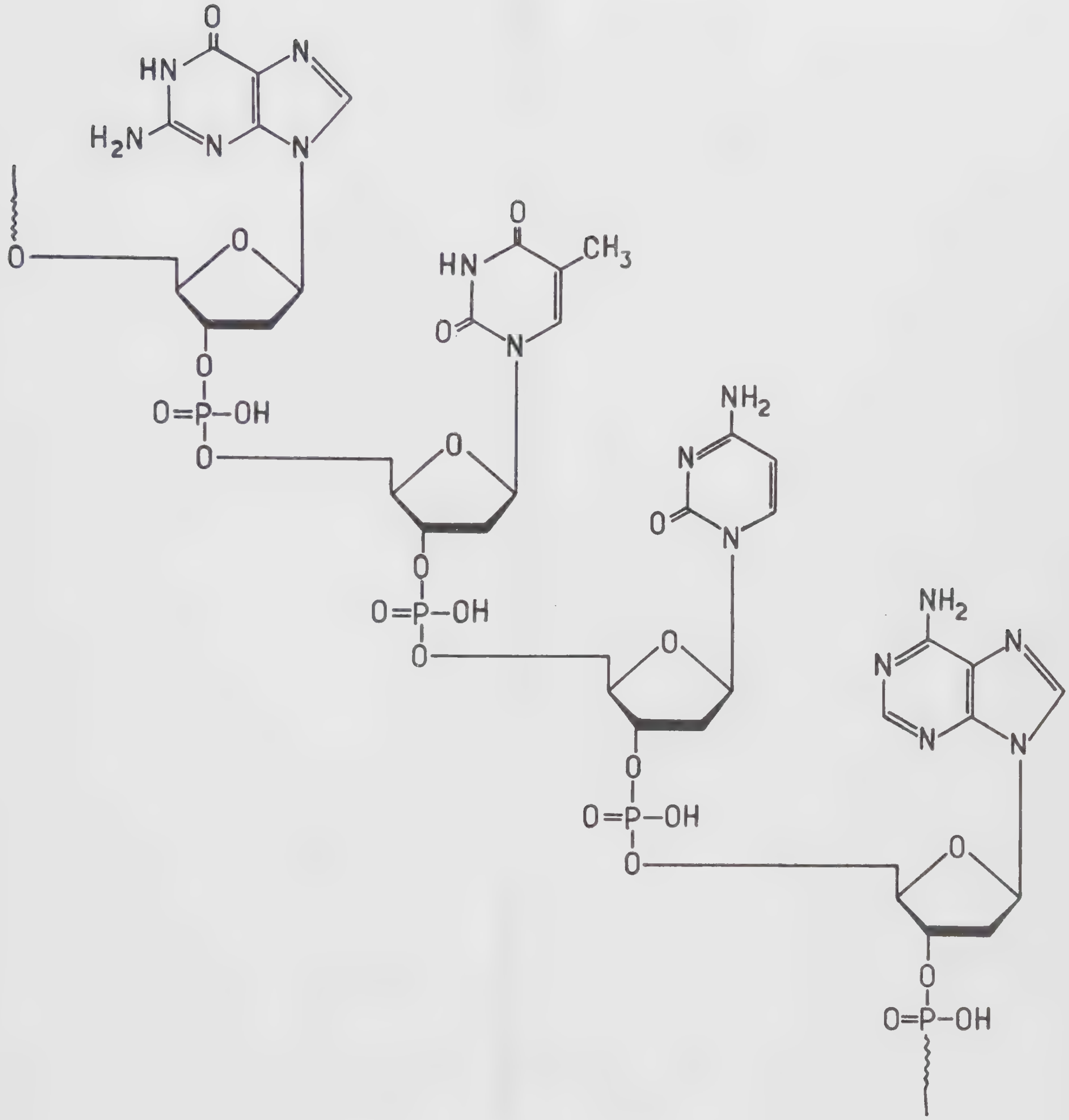


Fig. I-1 : STRUCTURE PRIMAIRE D'UNE PORTION DE L'UNE DES CHAÎNES DE L'ADN.

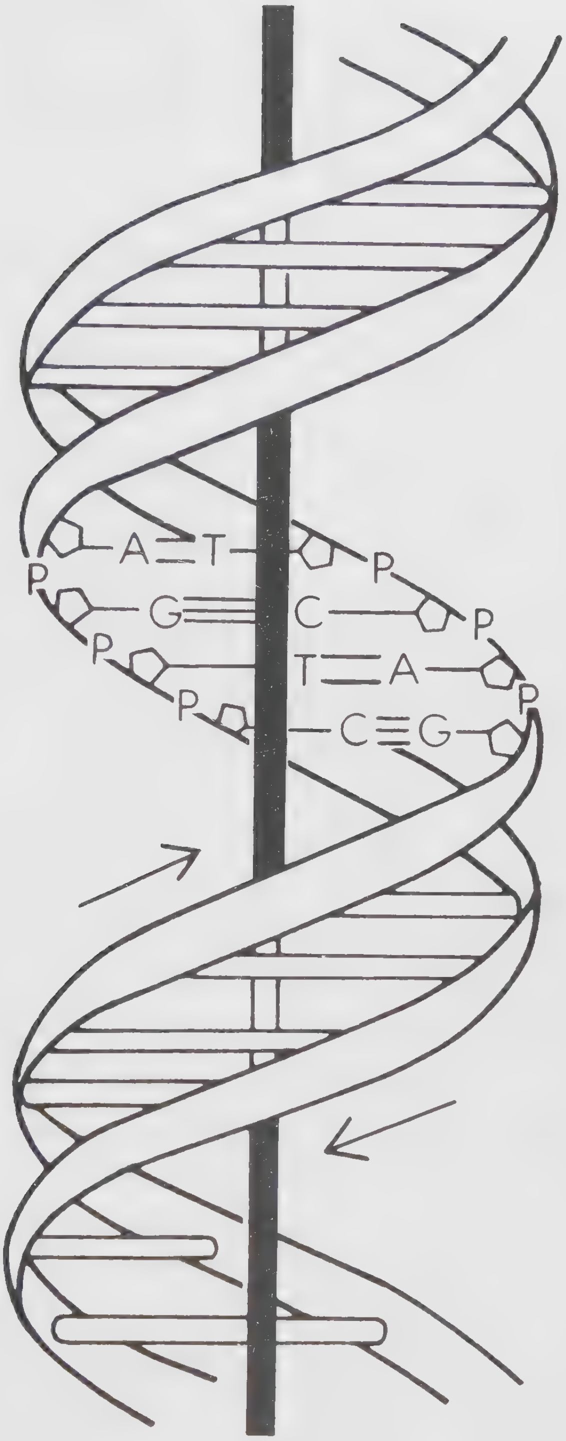


Fig. I-2 : STRUCTURE SECONDAIRE DE L'ADN D'APRES WATSON ET CRICK.

- assurent la transmission des caractères héréditaires au cours de chaque mitose, par copie de chacun des brins momentanément séparés.
- dirigent la synthèse protéique selon le schéma classique

$$ADN \xrightarrow{\textit{Transcription}} ARN \xrightarrow{\textit{Traduction}} \text{protéine}$$

I.2.2 - *L'ADN, molécule cible.*

Ce rappel de la structure de l'ADN permet de mieux comprendre pourquoi cette macromolécule, la plus "noble" de la cellule, est également la plus fragile et la plus sensible aux radiations. Cette fragilité de l'ADN est liée essentiellement à sa structure en fibres longues et minces (on sait combien, lors d'une simple manipulation d'une préparation d'ADN, les coupures de brins sont fréquentes à cause des forces de cisaillement hydrodynamiques). En outre, ces fibres sont rendues d'une part photosensibles du fait de la présence de bases comportant des liaisons insaturées, et d'autre part radiosensibles en raison de l'existence de liaisons attaquables par les radicaux issus de la radiolyse de l'eau (liaisons insaturées, liaisons N-glycosidiques, liaisons phosphodiester).

Le contenu informationnel très précis et très spécifique de l'ADN, et le contrôle exercé par ce dernier sur des mécanismes métaboliques aussi essentiels permettent de comprendre pourquoi cette macromolécule est la cible la plus vitale que frappent les radiations. Ainsi, une altération infime par rapport à la grandeur et à la complexité de la structure, pourra entraîner des désordres biologiques graves du fait de l'amplification de cette lésion par le métabolisme cellulaire.

I.3 - ABSORPTION D'ENERGIE PAR LA MATIERE.

I.3.1 - *Radiations ionisantes et non ionisantes.*

Lorsqu'un atome absorbe l'énergie d'un rayonnement ultraviolet, celle-ci agit sur les électrons périphériques qui changent de couche. Mais l'atome reste électriquement neutre. L'absorption par l'atome d'une énergie plus élevée, comme celle d'un rayonnement X par exemple, conduit à l'éjection d'un électron hors des couches

périphériques de l'atome. Ce dernier n'est plus neutre et acquiert une charge électrique positive. De plus, l'électron éjecté va charger négativement un autre atome. C'est la raison pour laquelle un tel rayonnement est appelé radiation ionisante, en opposition à un rayonnement tel que l'UV qui est appelé radiation non ionisante.

I.3.2 - *Interactions entre énergie et matière.*

I.3.2.1 - *Photon-matière.*

Lorsqu'un photon traverse un milieu, sa trajectoire est linéaire jusqu'au moment où il heurte une particule à laquelle il cède une partie plus ou moins importante de son énergie.

Il existe trois types d'interaction entre le photon et la particule :

- l'effet photoélectrique,
- l'effet Compton,
- la formation de paires (si énergie du photon > 1,02 MeV).

Dans les trois cas, il y a production d'électrons secondaires; ce sont eux qui produisent les effets terminaux (ionisation et excitation), et non pas les photons qui ne sont que les distributeurs d'électrons secondaires et leur source d'énergie.

I.3.2.2 - *Electron-matière.*

L'électron qui traverse un milieu perd de l'énergie par "collision" ou par simple "freinage". Lors d'une collision, il se produit un transfert d'énergie de l'électron incident vers l'électron choqué.

Si cette énergie est très faible, l'électron heurté n'est pas déplacé, et elle est transmise à l'atome ou à la molécule dont elle élève le niveau d'énergie.

Si l'énergie transférée est plus forte, l'électron peut être porté sur une orbite plus extérieure : on a *excitation*, ce qui conduit à une dissociation de la molécule si elle est petite, ou à des oscillations de celle-ci si elle est de grande taille.

Si l'énergie transférée est suffisamment forte, en l'occurence supérieure à l'énergie de liaison de l'électron, ce dernier peut être extrait, éjecté de l'atome : on a *ionisation*. Celle-ci est accompagnée presque simultanément de deux ou trois autres ioni-

sations provoquées par l'excédent d'énergie de l'électron éjecté. L'énergie moyenne perdue par ionisation primaire a été estimée dans de récents travaux à 40-60 eV /11/.

Ionisation et excitation sont à l'origine des effets biologiques.

I.3.3 - Action du rayonnement sur la matière vivante.

Il est à l'heure actuelle bien établi que lorsqu'une cellule ou un système biologique simple est soumis aux radiations, l'impact le plus important se situe au niveau du noyau, dans la mesure où l'ADN est son constituant essentiel /24,91/. Toutefois, des dégâts commis sur les autres constituants cellulaires ne sont pas négligeables et ont été largement étudiés : lésion de complexes protéiques, des membranes /35/, des lysosomes /114/, des ribosomes /45/, des histones /5/.

De plus en plus, les conséquences de cette irradiation : aberrations chromosomiques, perte d'activité biologique (inhibition de la division cellulaire, mutation, cancérisation, létalité ...) peuvent être expliquées en termes d'évènements moléculaires en certains points de l'ADN /48/. Le nombre et le type de ces évènements induits dans l'ADN dépendent de sa composition, de sa conformation, de la présence de sensibilisants ou de protecteurs, et des mécanismes de transfert d'énergie (Cf. I.3.2).

I.4 - ACTION DU RAYONNEMENT UV

I.4.1 - Généralités.

L'action des rayons ultra-violets sur les organismes vivants, et donc plus précisément sur l'ADN, est liée à la très forte absorption par ce dernier dans la région des 260 nm /92/, du fait de la présence des bases insaturées.

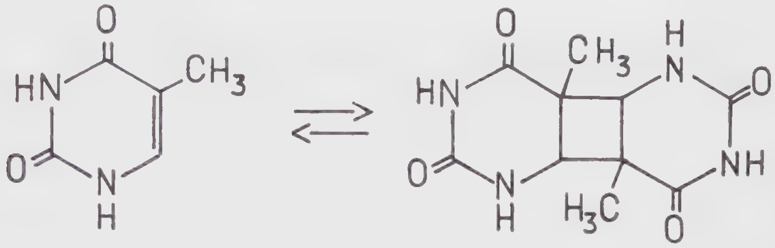
Les premières études sur l'irradiation UV de l'ADN remontent à 1941, et aux travaux de HOLLAENDER et coll. /72/ relatifs à l'incidence de ce rayonnement sur certaines propriétés physiques.

Une première conséquence de ce type d'irradiation est une dégradation de l'ADN (20 % dans les cellules bactériennes) accompagnée des lésions évoquées ci-après.

I.4.2 - *Action sur les pyrimidines.*

I.4.2.1 - *Dimérisation.*

Le phénomène de dimérisation a été mis en évidence pour la première fois en 1958 par BEUKERS et BERENDS [9,10], par irradiation UV de thymine en solution gelée. La réaction est la suivante

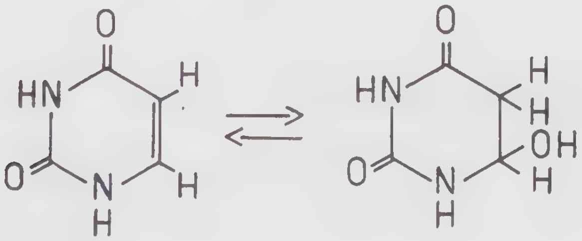


Les quatre isomères de conformation ont été récemment isolés [71,78]. La cytosine et l'uracile peuvent également donner des "homodimères" et "hétérodimères" du type $\widehat{UU}$, $\widehat{CC}$, $\widehat{CT}$ [48,147], les deux derniers donnant rapidement $\widehat{UU}$ et $\widehat{UT}$ par désamination de la cytosine.

Ce phénomène a été mis en évidence *in vivo* dans l'ADN des microorganismes [146,175] et des cellules humaines [125].

I.4.2.2 - *Hydratation.*

Cette fixation d'une molécule d'eau sur la double liaison 5-6 des pyrimidines a été la première réaction photochimique identifiée (1954) [145].



Les hydroxy-6 dihydro-5,6 uracile et hydroxy-6 dihydro-5,6 cytosine ont été observés dans des solutions aqueuses d'uracile /143,145/ et de cytosine /39/ soumises à une irradiation UV. La thymine semble résistante, bien que les hydrates de thymine aient été synthétisés chimiquement /116/ et leur stabilité reconnue.

De telles lésions ont pu être mises en évidence dans l'ADN de microorganismes /26,146/.

I.4.2.3 - Comparaison hydrate/dimère.

- *Les hydrates* provoquent une simple dénaturation locale de l'hélice de WATSON et CRICK, du fait de la rupture de quelques liaisons hydrogène /143,179/. Au point de vue génétique, ils sont essentiellement responsables des mutations. En effet, l'hydratation change le codage : $\overset{*}{C} = C_{H_2O}$ code comme T

$\overset{*}{U} = U_{H_2O}$ code comme C

Ainsi un triplet UUU (qui code normalement pour la phénylalanine) peut par irradiation UV donner $UU\overset{*}{U}$ qui code comme UUC, le codon de la sérine /59/.

- *Les dimères* provoquent non seulement une dénaturation locale par coupure de liaisons hydrogènes, mais également un gonflement, une déformation (qui d'ailleurs,permet la reconnaissance enzymatique du site lésé dans un processus de réparation que nous examinerons plus loin : Cf. I.6.2.2).

Les dimères sont une photolésion primaire /110,142/ plus grave que les hydrates, car ils entraînent la létalité cellulaire par arrêt de la synthèse de l'ADN ; en outre, ils ne sont pas transcrits par l'ARN messager.

I.4.2.4 - Autres lésions.

I.4.2.4.1 - Pontage pyrimidine-acide aminé.

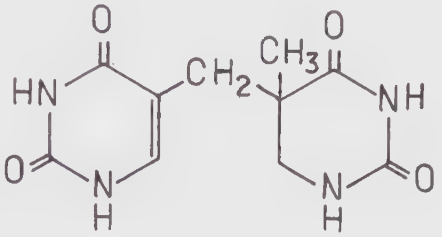
Ce type de réaction /136/ a été mis en évidence par SMITH et coll. /148/ qui ont obtenu, par irradiation UV d'un mélange de cystéine et d'uracile, un composé d'addition : le cysteine-5 dihydro-5,6-uracile.

Ce type de pontage induit *in vivo* des couplages protéines-acide nucléique /136,147/. Les modifications entraînées du point de vue fonctionnel ne sont pas exactement connues.

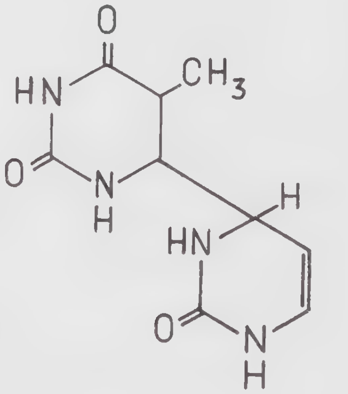
I.4.2.4.2 - Dimères particuliers.

Des dimères d'un type particulier ont été isolés récemment :

- d'une part des composés du type thyminyl-5 dihydro-5,6 thymine /170/



- d'autre part des composés provenant d'une association thymine-cytosine suivie de la désamination de la cytosine /173/.



Ce type d'association a également été noté entre deux molécules de thymine /124,171/.

I.4.3 - Action sur les purines.

La photochimie des purines est encore assez peu étudiée (et donc peu connue) du fait de leur photosensibilité dix fois moindre que celle des pyrimidines. Leur contribution à l'ensemble des lésions n'est cependant pas négligeable.

I.4.4 - *Cassures de chaînes.*

Il est généralement admis que les photons UV absorbés ne peuvent être directement responsables d'une cassure de chaîne. Mais de telles coupures peuvent toutefois apparaître :

- en présence de certains photosensibilisants /25,69/, le nombre de simples ruptures entraînées pouvant devenir aussi important que celui des dimères /28/.

- comme réaction secondaire d'un processus de réparation par excision des dimères (Cf. I.6.2.2)

I.5 - ACTION DES RAYONNEMENTS IONISANTS.

I.5.1 - *Généralités.*

L'action des rayonnements ionisants est plus énergétique que celle des rayons ultra-violets, et beaucoup moins spécifique. En effet, les particules chargées attaquent sans aucune discrimination les acides nucléiques, les protéines, les lipides ou les molécules d'eau.

I.5.2 - *Effets direct et indirect.*

Les radiations ionisantes ont deux modes d'action différents sur une grosse molécule telle que l'ADN :

- l'effet direct : la molécule reçoit l'énergie directement de la radiation incidente.
  Ceci est observé pour : - l'ADN irradié en solution gelée
  - l'ADN irradié à l'état sec.

- l'effet indirect : la radiation incidente provoque l'apparition, par radiolyse de l'eau, d'espèces radicalaires très réactives qui vont transférer leur énergie à la molécule d'ADN et réagir avec elle. C'est le cas de l'ADN irradié en solution aqueuse diluée.

Il est bien connu que le milieu cellulaire est composé essentiellement d'eau (85 à 95 %), et par conséquent l'action du rayonnement sur la matière vivante se produira essentiellement de façon indirecte /80/.

Rendement radiochimique.

Il définit la fraction de l'énergie absorbée par le milieu, qui a été transformée en énergie chimique. Il s'exprime en nombre de molécules transformées par 100 eV.

$$G = \frac{\text{nb de molécules transformées}}{100\ \text{eV}}$$

I.5.3 - *Radiolyse de l'eau.*

Un bref rappel sur son mécanisme permet de mieux comprendre l'action radicalaire du rayonnement sur une solution aqueuse d'ADN.

1ère étape : Absorption de l'énergie de la radiation par H_2O selon différents processus /11,94/ :

$$H_2O \xrightarrow{\gamma} H_2O^* \rightarrow H^\bullet + OH^\bullet \quad (1)$$

$$H_2O^* \rightarrow H_2O + Q \quad (2)$$

$$H_2O \xrightarrow{\gamma} H_2O^+ + e^- \quad (3)$$

2ème étape : Transformation rapide des entités instables produites précédemment /94/ :

$$H_2O^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+ + OH^\bullet \quad (4)$$

$$e^- + n\,H_2O \rightarrow e^-_{\text{aqueux}} \quad (5)$$

Il s'écoule 10^{-14} secondes /11/ entre la production de l'espèce H_2O^+ selon (3) et sa transformation selon (4) ; de même, entre la production d'un électron en (3) et son hydratation en (5), le temps écoulé n'excède pas 10^{-11} à 10^{-12} secondes /11/.

D'autres réactions de recombinaison sont fréquentes /11,68/ :

$$OH^\bullet + OH^\bullet \rightarrow H_2O_2 \quad (6)$$

$$e^-_{aq} + e^-_{aq} \xrightarrow{2\,H_2O} H_2 + 2\,OH^- \quad (7)$$

$$H^\bullet + H^\bullet \rightarrow H_2 \quad (8)$$

$$e^-_{aq} + H_2O^+ \rightarrow H^\bullet + H_2O \quad (9)$$

De nombreuses autres réactions secondaires sont possibles donnant naissance à d'autres produits secondaires. Leurs probabilités relatives sont liées aux constantes de vitesse, au pH, à la présence ou l'absence d'oxygène et de capteurs radicalaires ...

Le G de formation des espèces issues de la radiolyse de l'eau (pH = 6) nous donne leur importance relative :

$G(H^{\cdot}) = 0,55 \quad G(OH^{\cdot}) = 2,7 \quad G(e^{-}_{aq}) = 2,65$

$G(H_2O_2) = 0,70 \quad G(H_2) = 0,44$

ou sous une autre forme /11/ :

$$H_2O \overset{\gamma}{\rightsquigarrow} 0,70\ H_2O_2 + 0,45\ H_2 + 2,70\ OH^{\cdot} + 2,65\ e^{-}_{aq} + 0,55\ H$$

I.5.4 - *Lésions produites.*

I.5.4.1 - *Dégradation de l'ADN.*

Les rayonnements X ou γ entraînent une dégradation importante (80 %) de l'ADN des cellules bactériennes /51,111,151/. La radiosensibilité d'une espèce et l'importance de la dégradation de son ADN varient dans le même sens au cours du cycle cellulaire /164/. Il paraît peu probable que ce phénomène fasse partie intégrante des processus de réparation /163/. Des enzymes préexistantes dans la cellule /164/, telles que l'ADN polymérase /163/, semblent toutefois impliquées.

Les principales radiolésions sont étudiées ci-après.

I.5.4.2 - *Simples cassures.*

Il s'agit de la rupture d'un seul brin en un ou plusieurs points. Elles sont produites par effet direct à l'état sec /86/, mais le reste du temps résultent d'un effet indirect, en l'occurence l'attaque de radicaux $OH^{\cdot}$ /1,32,38,99,176/.

Les simples cassures ont été observées aussi bien chez les microorganismes /58a,97/ que les cellules de mammifères /100,117,119/. Leur nombre augmente linéairement avec la dose de rayonnement /60,98,100,103/ ; il est généralement mesuré par ultracentrifugation en gradient de sucrose alcalin /86/, méthode mise au point par Mac. GRATH et WILLIAMS /58b/.

La nature chimique des ruptures des liaisons phosphodiester est encore mal connue : bien qu'ayant fait l'objet de nombreux travaux,

les résultats ne sont pas toujours très convergents. La probabilité de présence de groupements phosphoester en 5' et hydroxyl en 3' /14,33b,37,47,58a,77/ paraît plus importante que celle de la situation inverse. Une configuration qui est également souvent suggérée est la suivante /14,166/ : présence d'un groupement phosphoester sur une extrémité et d'un résidu osidique modifié ou scindé sur l'autre extrémité.

1.5.4.3 - *Doubles cassures.*

Il s'agit de la rupture des deux brins de la molécule d'ADN en des points opposés ou relativement proches. Alors qu'à l'état sec (effet direct) les deux cassures résultent de l'impact d'une seule particule ionisante sur les deux brins, en solution ce sont deux radicaux indépendants qui produisent les deux cassures /60/.

Il est intéressant de noter que leur fréquence est supérieure à ce que l'on pourrait attendre d'après la fréquence des simples cassures supposées réparties au hasard /91/. Ceci peut s'expliquer dans la mesure où la première cassure provoque une dénaturation locale (perte de liaisons H)et, ainsi la seconde cassure se trouve facilitée : elle n'a pas besoin d'être rigoureusement en face de la première, mais seulement dans un environnement de quelques nucléotides adjacents /54,60/.

La mesure des doubles cassures est généralement effectuée par ultracentrifugation en gradient de sucrose neutre /96,100,103/. Elles ont été observées en solution aqueuse /33a,54,60/,mais aussi chez les microorganismes /169/ et dans les cellules de mammifères /96,100/ ; leur nombre augmente linéairement avec la dose de rayonnement /33b,34,96,98/ ou le carré de cette dose /60/.

Influence de l'oxygène

L'influence de l'oxygène sur la production de simples et doubles cassures semble assez controversée. Si certains auteurs dénotent un effet sensibilisant de l'oxygène sur la production de simples /55,79,97,98,119,169/ ou doubles cassures /55,169/, d'autres ne constatent aucun effet de l'oxygène /113/, voire dans certains cas un effet protecteur /46/. Cette contradiction semble résolue par les derniers travaux de HORGAN /73/ : l'influence enregistrée de

l'oxygène sur la production de cassures serait liée à la technique d'analyse de celles-ci.

I.5.4.4 - "*Cross-link*".

Des pontages ou *cross-link* ont été observés entre chaînes d'ADN [13,33a,99,101] par obtention de composés dont le poids moléculaire moyen est supérieur à celui de la molécule initiale. Ce phénomène se produit à des doses d'irradiation relativement faibles. La nature de ces *cross-link* et leur mode de formation ne sont pas encore complètement connus.

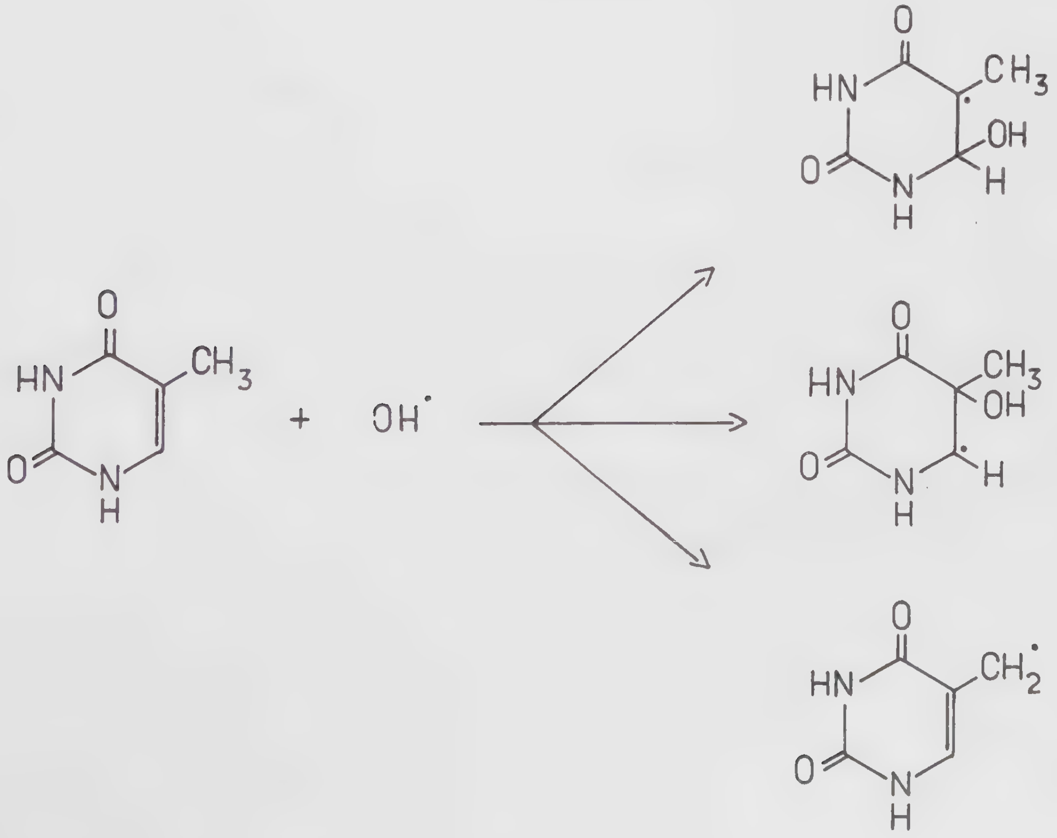
Par ailleurs, le rayonnement γ induit également des pontages entre chaîne d'ADN et protéine [11,13].

I.5.4.5 - *Aperçu des modifications chimiques*.

I.5.4.5.1 - *Au niveau de la base : radiolyse de la thymine*.

En milieu aqueux aéré:

Les radicaux $OH^{\cdot}$, issus de la radiolyse de l'eau, attaquent principalement la molécule de thymine au niveau de la double liaison 5-6 et du méthyl pour donner naissance aux radicaux suivants [22,154] :

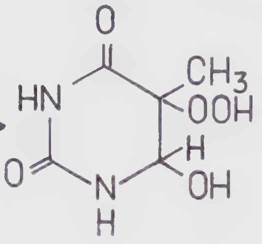


[1]

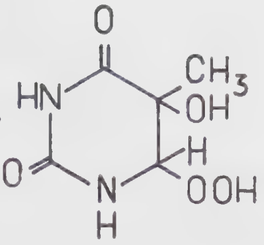
[2]

[3]

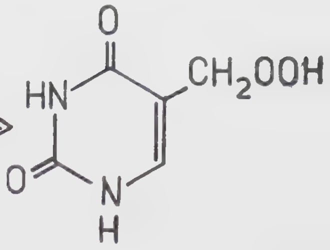
lesquels se stabilisent en présence d'oxygène en conduisant aux peroxydes suivants /19,20,22,44,154/ :

[1] → 

hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine

[2] → 

Hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine

[3] → 

hydroperoxyméthyl-5 uracile

On peut également avoir formation d'hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymine et d'hydroperoxy-6 dihydro-5,6 thymine /22,154/ qui sont des peroxydes mineurs.

Les produits de radiolyse résultant de la dégradation de ces peroxydes sont /154,159/ :

- dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis* et *trans*
- acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique
- acétylurée
- urée
- formyl-N pyruvyl-N' urée
- hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne
- formyl-5 uracile.

En milieu aqueux désaéré.

Les principaux radioproduits sont /154/ :

- dihydro-5,6 thymine
- hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine
- hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine *cis* et *trans*
- dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis* et *trans*
- hydroxyméthyl-5 uracile.

I.5.4.5.2 - *Au niveau du nucléoside : radiolyse de la thymidine.*

En milieu aqueux aéré.

Les sites d'attaque des radicaux sont /16/ :

⁕ ceux observés sur la thymine à 80 % en l'occurence la double liaison 5-6 et le groupement méthyl.

Les radicaux thymidyle correspondants se stabilisent en présence d'oxygène en donnant naissance aux peroxydes /20,23,178/ :

- hydroperoxy-6 hydroxy-5 dihydro-5,6 thymidine *cis* et *trans*
- hydroperoxy-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidine *cis* et *trans*
- hydroperoxyméthyl-5 desoxy-2' uridine.

* la liaison N-glycosidique (rupture par attaque du carbone 1' du desoxyribose) et le cycle osidique (carbones 1' et 3') /16,133/.

Les produits de radiolyse peuvent se regrouper ainsi /16,23/ :

Dérivés nucléosidiques à liaison 5-6 saturée.

- dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine *cis* et *trans*
- acide (désoxy-2-β-D *érythro*-pentofuranosyl)-1 hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique

Dérivés nucléosidiques résultant de l'ouverture ou du réarrangement du cycle pyrimidique.

- N (désoxy-2-β-D *érythro*-pentofuranosyl) N-formyl urée
- N (désoxy-2-β-D *érythro*-pentofuranosyl) formamide
- (Désoxy-2-β-D *érythro*-pentofuranosyl)-1 hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne
- N (désoxy-2-β-D *érythro*-pentofuranosyl) urée

Dérivés nucléosidiques avec CH_3 oxydé.

- hydroxyméthyl-5 désoxy-2' uridine
- formyl-5 désoxy-2' uridine

Produits résultant de la rupture de la liaison N-glycosidique.

- γ désoxyribonolactone
- les principaux produits de radiolyse de la thymine.

En milieu aqueux désaéré:

Les principaux radioproduits sont /16/ :

- dihydro-5,6 thymidine
- hydroxy-5 dihydro-5,6 thymidine
- hydroxy-6 dihydro-5,6 thymidine *cis* et *trans*
- dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymidine *cis* et *trans*
- hydroxyméthyl-5 désoxy-2' uridine
- γ désoxyribonolactone.

I.5.4.5.3 - *Etude au niveau du fragment thymidylique de l'ADN (in vitro et in vivo).*

Les différentes altérations radio-induites des bases pyrimidiques et puriques de l'ADN sont à l'origine des effets biologiques des radiations ionisantes pour une part au moins aussi importante que les autres radiolésions précédemment évoquées /48,53, 82,93,168/. Toutefois, les publications de travaux relatifs à la recherche et la caractérisation de telles altérations demeurent rares et fragmentaires.

Il faut trouver la principale (l'unique ?) explication de cette apparente contradiction dans les difficultés rencontrées lors de l'isolement et de la caractérisation de microquantités de radioproduits qui, en outre, ont tous plus ou moins tendance à se dégrader au cours des hydrolyses de l'ADN sensées les libérer. Ainsi, la présence d'urée, fréquemment notée dans les hydrolysats d'ADN irradié, est tout simplement due à une dégradation des dérivés pyrimidiques à double liaison 5-6 saturée.

Les modifications susceptibles d'apparaître sur le fragment nucléosidique de l'ADN ont, par conséquent, souvent été supposées par extrapolation des résultats obtenus lors des études préliminaires indispensables effectuées au niveau de la base ou du nucléoside isolés. Cette extrapolation ne peut cependant donner qu'une idée approximative du comportement éventuel de l'ADN, compte-tenu du fait que la base libre est beaucoup plus radiosensible que lorsqu'elle est insérée dans la macromolécule enroulée en double hélice /12,46/.

Un rappel bibliographique chronologique des principaux travaux effectués mettra en évidence leur caractère partiel précédemment évoqué.

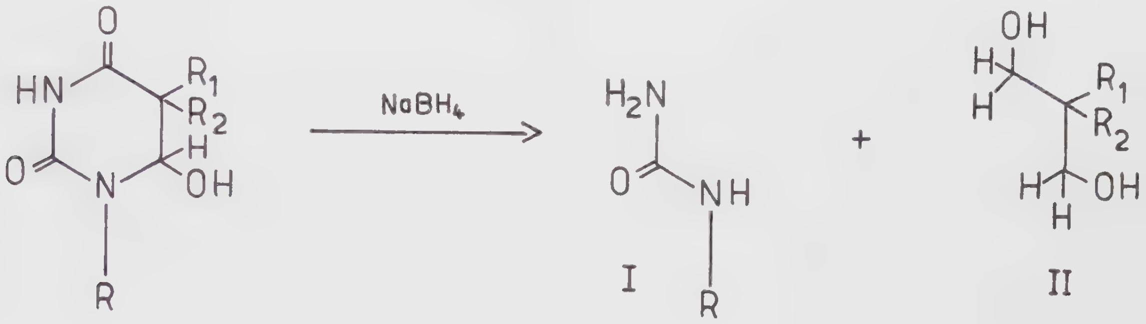
Les premières recherches relatives à l'étude des modifications chimiques radioinduites dans l'ADN ont débuté il y a une vingtaine d'années. Dès 1954, la chute progressive de l'absorption UV, caractéristique de la double liaison 5-6 des pyrimidines, est notée par BARRON /3/ après irradiation d'une solution aqueuse d'ADN à des doses croissantes. Peu après, la présence de peroxydes est caractérisée par SCHOLES, WEISS et WHEELER /38,135,177/ dans les solutions aqueuses d'ADN irradiées aux rayons X ; ces peroxydes semblent être le fait des bases pyrimidiques uniquement. Ils seront par la suite largement étu-

diés au niveau de la base isolée [19,22,44,93,177], mais leurs implications biologiques en tant que radiolésion primaire sont très tôt reconnues [93]. Quelques années plus tard, SCHOLES, WARD et WEISS précisent cette notion de peroxydes dans l'ADN [134] ; par détermination de l'étendue de la destruction des bases (comprenant les hydroperoxydes), ils estiment à 80 % l'attaque radicalaire au niveau de celles-ci. Par ailleurs, le seul peroxyde issu de l'ADN, suffisamment stable pour être isolé par précipitation à l'acide trichloracétique, est essentiellement celui associé à la molécule de thymine. Plus récemment, des études cinétiques de décomposition ont été effectuées sur les peroxydes issus d'une irradiation γ d'ADN en solution aqueuse [137], et concluent à une localisation préférentielle sur les deux bases pyrimidiques.

En 1960, HEMS met en évidence la libération des quatre bases constitutives [70] ; la quantité de bases libérées (donc de sucre attaqué) était approximativement égale au quart des bases détruites. Quelques années plus tard, EKERT et TISNE étudient quantitativement la destruction des bases en relation avec la structure secondaire de polyribonucléotides [46]. En 1967, KRUSHINSKAYA et SHAL'NOV [89] soulignent la libération d'aldéhyde malonique dans l'ADN irradié, selon un mécanisme (coupure de la liaison 3'-4' du cycle pentose) qui, par la même, rend compte de la libération de la base adjacente et de la formation concomitante d'une simple cassure de chaîne. L'existence d'un groupement phosphate sur l'extrémité 5' d'une telle cassure (présence inhérente au mécanisme proposé) est en accord avec les travaux de BOPP et HAGEN [14,33b] ; cependant la présence d'aldéhyde malonique paraît aujourd'hui fort contestée [16,66]. Un mécanisme rendant compte de la libération de la base à la suite du traitement de l'ADN par H_2O_2 est établi par RHAESE et FREESE [126]. La libération *in vitro* d'oligonucléotides a été observée [144]. Récemment, ULLRICH et HAGEN [166] ont noté la libération de nucléosides (dont 60 % portent une altération du sucre) et de bases ; la présence d'aldéhyde malonique est observée mais en tant que produit mineur, qui de toute façon, ne contribuerait que très faiblement à la scission de la chaîne. Ces constatations au sujet de l'aldéhyde malonique sont corroborées par les travaux de HARTMANN et SONNTAG au niveau du sucre [66]. Récemment, la présence d'altérations au niveau de la base ou du désoxyribose a été montrée par des méthodes indirectes : d'une part

des défauts d'appariement sont mis en évidence dans l'hybridation entre un ADN vierge et un ADN irradié /36/ ; d'autre part, des bases erronées sont incorporées dans les chaînes d'ADN synthétisées par l'ADN polymérase à partir d'un ADN irradié /132/.

CERUTTI et coll. ont mis au point /26/ une méthode de dosage indirect des défauts du type dioxo-2,4 hydroxy-6 (ou hydroperoxy-6) dihydro-5,6 pyrimidine, basée sur l'action réductive du borohydrure de sodium.

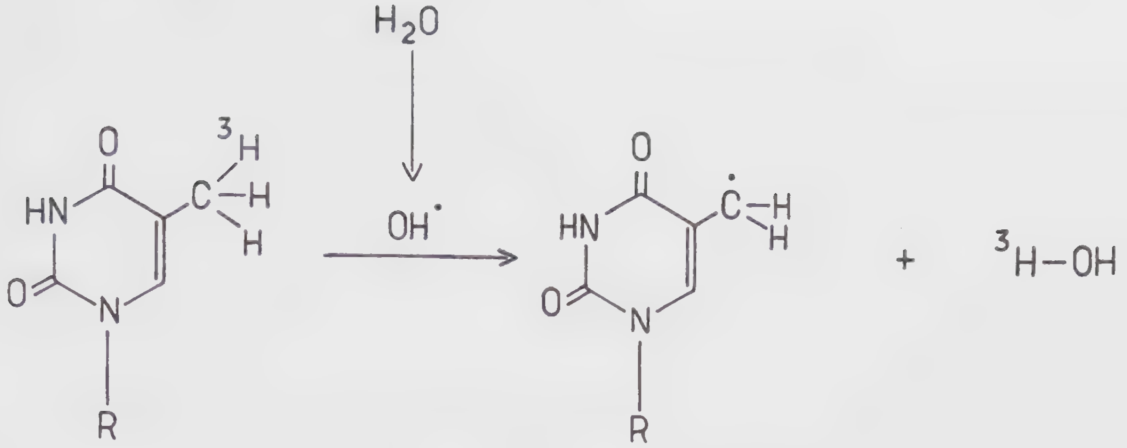


R_1 = H ou CH_3,
R_2 = OH ou OOH

I = urée désoxyriboside
II = méthyl-2 glycérol si R_1 = CH_3
R_2' = OH.

Par cette méthode, HARIHARAN et CERUTTI /63,64/ ont pu détecter et doser la présence d'hydroperoxy-5 dihydro-5,6 thymine et/ou de glycols de thymine dans l'ADN de la bactérie *Micrococcus radiodurans* irradiée. L'élimination de ces défauts s'effectue selon un processus en deux temps. De plus, l'ensemble des défauts au niveau des quatre bases réunies est le type de lésion de loin le plus important chez cette bactérie (beaucoup plus que les cassures de chaînes). Par la suite, ces mêmes auteurs ont dosé le même type de défaut dans l'ADN de cellules d'hamster soumises au rayonnement γ /107/. Ce dosage par réduction au borohydrure a cependant une portée limitée : il ne permet de rendre compte que partiellement des défauts au niveau de la base, tant qualitativement que quantitativement.

Au cours des six derniers mois, CERUTTI et coll. ont publié trois mémoires particulièrement intéressants. Une méthode, basée sur la production d'eau tritiée à partir du marquage au tritium du groupement méthyl de la thymine, a été mise au point et permet une mesure de la réactivité de ce groupement CH_3 /152/ :



Cette méthode, ainsi que la précédente, a permis de mettre en évidence un effet protecteur de l'enroulement en double chaîne d'une part, du milieu de culture d'autre part /152/. C'est également par cette double voie que ROTI ROTI et CERUTTI ont pu effectuer, dans une certaine mesure, la transition *in vitro* → *in vivo* par étude comparative de la radiosensibilité de la chromatine native, de la chromatine reconstituée et de préparations nucléoprotéiques. Il s'avère que les protéines chromosomiques exercent un fort effet protecteur sur la thymine vis-à-vis de l'attaque des radicaux issus de la radiolyse de l'eau /129/. Ces mêmes auteurs ont enfin mis en évidence, qualitativement et quantitativement, la réactivité du groupement méthyl de la thymine dans l'ADN des cellules d'hamster soumises à une irradiation γ /128/. La production d'eau tritiée, qui varie linéairement avec la dose, est très sensibilisée par l'oxygène, et s'accompagnerait probablement de la formation de radicaux méthylène-5 uracile.

Signalons pour terminer que depuis quelques années la production et le mécanisme de formation de radicaux dans l'ADN sont étudiés par des méthodes spectroscopiques telles que la R.P.E. /118,167,180/, en relation avec le même type d'études sur la base ou le sucre isolé /76,102/.

En résumé, nous constatons que la connaissance des radiolésions du fragment thymidylique et, de façon plus générale, du fragment nucléosidique de l'ADN demeure très limitée à ce jour.

C'est une contribution à l'amélioration de cette connaissance, sous l'angle *in vitro*, et sur la base de données maintenant solides au niveau de la radiochimie de la thymine et de la thymidine (notamment grâce aux travaux effectués dans ce laboratoire), qui fait l'objet du présent mémoire.

La première partie de ce travail est consacrée à l'identification des divers radioproduits de coupure directe de la liaison glycosylamine de l'ADN irradié en solution aqueuse aérée /155,158/ et désaérée /157/. Dans une seconde partie, les radioproduits non exclus de la chaîne au cours de l'irradiation sont étudiés, après leur élimination de celle-ci, par deux méthodes d'hydrolyse douce qui sont décrites et discutées /156/.

1.5.5 - *Inactivation biologique.*

Il est intéressant de savoir comment les altérations précédemment décrites entraînent l'inactivation des propriétés biologiques des acides nucléiques et quelle est la contribution d'un radical donné dans celle-ci. Les lésions inactivantes sont généralement décrites comme celles bloquant la réplication de l'ADN /52/.

Les principales lésions radio-induites dans l'ADN sont responsables pour une grande part de la perte de l'activité biologique /52/, la plus étudiée étant la possibilité pour un ADN infectieux de pénétrer et se développer dans la bactérie hôte. Ceci a été noté pour les simples cassures /13,52,105,153,168/, les doubles cassures /13,52,53,74,168/, les altérations des bases /52,53,153,168/ et les "cross-link" /13,52/. Les altérations des bases semblent jouer un rôle prépondérant; ainsi VAN der SCHANS et coll. /168/ estiment à 80 % la contribution de ce type de lésion dans l'inactivation de l'ADN du bactériophage PM2.

Les espèces radicalaires $OH^{\cdot}$, e^{-}_{aq}, $H^{\cdot}$, issues de la radiolyse de l'eau, participent toutes trois à la perte de l'activité biologique de l'ADN. Toutefois, le radical $OH^{\cdot}$ semble jouer un rôle prépondérant /12,74,153/ : ainsi dans le cas de l'ADN de bactériophage en solution aqueuse diluée, on admet les proportions suivantes dans la perte des propriétés infectieuses : $OH^{\cdot}$: 50 %, e^{-}_{aq} : 45 %, $H^{\cdot}$: 5 % ; en solution concentrée, l'inactivation par $OH^{\cdot}$ est estimée à 95 %. Ces données corroborent le rôle majeur des lésions radio-induites sur la base (*vide supra*), puisque les espèces $OH^{\cdot}$ et e^{-}_{aq} attaquent principalement les bases.

I.6 - REPARATION.

I.6.1 - *Introduction*

I.6.1.1 - *Historique*.

Le développement de la vie au cours des millénaires (et le maintien de celle-ci) s'est effectué dans des conditions de survie souvent précaires. Tous les organismes sont constamment soumis aux agressions du milieu extérieur (rayonnement, variation de température, ...). On conçoit donc très bien la nécessité que se soient développés dans ces organismes, au cours de l'évolution biologique, des systèmes de protection et de réparation du matériel héréditaire.

Cette notion de réparation s'est imposée de façon plus concrète lors du développement de la radiothérapie dans le traitement des cancers. On s'aperçut qu'une dose de radiation délivrée sur un temps court peut provoquer une radiodermite, alors que la répartition de cette même dose échelonnée sur plusieurs semaines n'engendre pas (ou peu) de telles lésions. C'est donc qu'entre deux séances d'irradiation, il se produit une réparation des lésions amorcées.

La connaissance à l'échelon moléculaire des divers processus de réparation est extrêmement récente et encore incomplète.

I.6.1.2 - *Généralités*.

Les processus de réparation sont dûs à des enzymes, dont certaines ont pu être isolées et purifiées. L'existence de ces enzymes est un caractère héréditaire qui peut être perdu par mutation. Cette perte, qui entraîne une radiosensibilisation, peut être due à l'absence de l'enzyme, mais aussi à sa non fonctionnalité [87] (elle est présente mais ne peut fonctionner du fait que toutes les conditions métaboliques ne sont pas réunies).

Chez les microorganismes, la corrélation entre radiorésistance et réparation peut être souvent effectuée. Et l'on sait rendre radiosensibles artificiellement -par mutation- des bactéries qui ne le sont pas dans leur état sauvage.

Nous allons maintenant évoquer les différents processus de réparation connus à ce jour.

I.6.2 - *Description des mécanismes*.

Trois types de réparation semblent admis à l'heure actuelle :

- la photorestauration
- la réparation par excision
- la réparation par recombinaison ou réparation de post-réplication.

I.6.2.1 - Photorestauration.

Ce type de mécanisme, découvert en 1949 par KELNER [85], répare uniquement les dimères de pyrimidines produits par le rayonnement UV. Il consiste en une monomérisation du dimère effectuée *in situ* par une enzyme dite enzyme de photorestauration car son action est initiée par la lumière (330 à 550 nm) [139,140].

Tous les êtres biologiques semblent subir ce type de réparation [104,120], à l'exception des mammifères placentaires chez lesquels l'enzyme correspondante est absente [140].

I.6.2.2 - Réparation par excision.

La cellule, en l'absence de lumière, peut se débarasser des dimères par un processus découvert en 1964 par SETLOW et CARRIER [141] et BOYCE et HOWARD-FLANDERS [15,75]. Ce type de restauration semble, aujourd'hui, pouvoir être étendu à d'autres types de défauts *(vide infra)*, en particulier aux lésions créées par le rayonnement γ.

Le mécanisme peut se résumer ainsi (fig. I-3) :

La présence de dimère ou d'autres défauts sur la chaîne crée une distorsion, une déformation stérique qui permet la reconnaissance du site lésé par une endonucléase [67]. Cette enzyme incise de façon spécifique le brin d'ADN en 5' par rapport au dimère [90]. Un oligonucléotide de longueur variable contenant le dimère est libéré et serait dégradé en nucléotides élémentaires par une exonucléase [90]. La partie manquante est ensuite restituée par insertion, effectuée par l'ADN polymérase, de nucléotides dans le sens 3' → 5' : le brin opposé fournit le codage [122] qui permet la restitution intacte de la chaîne complémentaire. Pour terminer, une ligase assure la jonction de la partie nouvellement synthétisée avec le brin intact.

Cettains auteurs ont présenté une variante de ce mécanisme ("cut and patch") selon laquelle l'excision de l'oligonucléotide renfermant le dimère interviendrait après la synthèse de l'oligonucléotide de remplacement ("patch and cut") [61].

Ce processus appliqué aux dimères existe dans de nombreuses lignées de cellules, y compris les cellules humaines [8,104,120,125]. Il a été prouvé que les cellules épidermiques de malades atteints de *Xeroderma Pigmentosum* (maladie qui rend les patients sensibles à la lumière solaire et sujets au cancer cutané) présentaient une incision initiale *(vide supra)* déficiente entraînant une très faible excision de dimères [29,30,31].

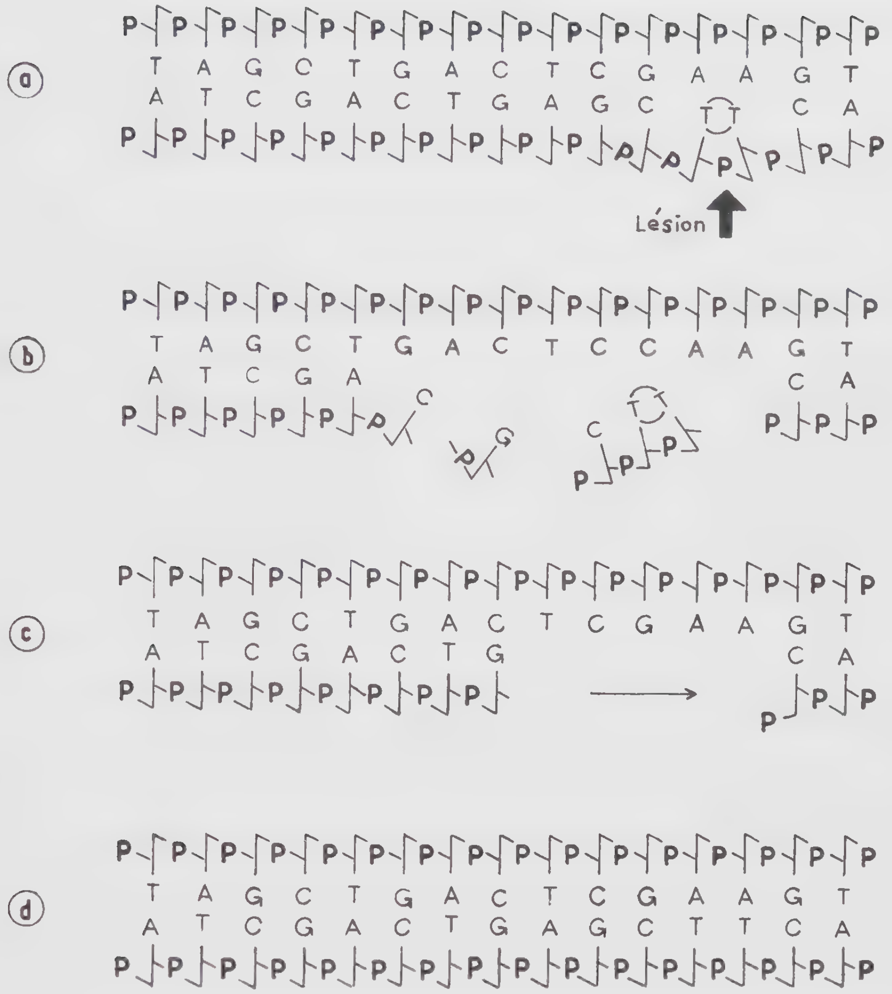


Fig. I-3 : MECANISME DE REPARATION PAR EXCISION.

a = Chaîne d'ADN contenant un dimère.

b = Excision d'un oligonucléotide contenant le dimère

c = Synthèse de fragment éliminé

d = Jonction du fragment resynthétisé.

Ce mécanisme d'excision assure l'élimination de tous les types de dimères décrits par ailleurs /172/, mais aussi, des défauts résultant de l'action du gaz moutarde ou de la mitomycine sur l'ADN /67/. En outre, il paraît de plus en plus certain que ce type de restauration soit impliqué dans l'élimination des principales lésions provoquées par le rayonnement γ.

Le fait que l'endonucléase assurant l'incision initiale reconnaisse la distorsion créée par le défaut et non le défaut lui-même était admis depuis longtemps /67/ et plaidait en faveur de l'hypothèse précédente. Des travaux récents /121/ ont prouvé sans ambiguité qu'un extrait de *Micrococcus lutéus* connu pour contenir une activité endonucléolytique envers un ADN irradié aux UV présentait la même activité envers un ADN irradié aux rayons γ. Et il semble très improbable que cette endonucléase, spécifique des distorsions, puisse effectuer l'incision si les autres enzymes impliquées dans la réparation par excision étaient incapables d'achever le processus.

L'élimination de bases modifiées (peroxydes et/ou glycols de thymine), mise en évidence quantitativement chez la bactérie *Micrococcus radiodurans* /63,64/ ainsi que dans les cellules ovariennes de hamster /107/, devrait obéir à un mécanisme d'excision. Pour une irradiation de 150 Krads, 75 % de ces composés sont éliminés et passent dans la fraction acido-soluble durant les trente premières minutes.

La réparation des simples cassures /58b,77,84,103,108/ et, de façon moindre, des doubles cassures /34/ est un phénomène reconnu. Il paraît certain que le mécanisme comprend, dans le cas le plus général, les trois dernières étapes du processus d'excision, la cassure jouant le rôle de l'incision initiale /30,75,83/. En effet, l'intervention terminale de la ligase assurant la jonction des brins /77/, précédée d'une réparation de la lésion généralement portée par l'une des extrémités de la cassure, a été souvent évoquée ces dernières années /58a,83,108/.

La réparation des simples cassures est plus facile et plus probable que celle des doubles cassures du fait que les extrémités sont maintenues en position par le brin intact /91/.

I.6.2.3 - Réparation par recombinaison.

Outre ces processus de réparation purement enzymatiques, il existe un mécanisme génétique de réparation des radiolésions : la recombinaison, mise en évidence par HOWARD-FLANDERS et BOYCE [75]. Ce processus est extrêmement efficace : il permet la survie de mutants *exc*⁻ soumis à une irradiation UV, bien que les dimères photoformés n'aient pas été éliminés. Il annihile également, très probablement, les lésions létales dues aux radiations ionisantes [88]. Chez les bactéries irradiées, il semblerait que ce mécanisme entre en jeu avant le processus par excision ; ce dernier n'interviendrait qu'à partir du moment où les doses administrées sont telles que les étapes initiales de la replication (qui initient la recombinaison) sont bloquées.

Cette réparation de post-réplication semble se passer ainsi (fig. I-4) :

L'ADN contenant des radiolésions se réplique et donne naissance à deux brins homologues laissant apparaître des zones vides à l'opposé des régions lésées de la chaîne parentale [88,130] ; ceci explique le poids moléculaire plus faible de l'ADN nouvellement synthétisé [130]. La zone oligonucléotidique manquante est comblée à partir du fragment opposé du brin parental intact : c'est la recombinaison proprement dite [131]. La synthèse de la partie nucléosidique transférée serait assurée par la même ADN polymérase [75] que celle impliquée dans le processus d'excision, et achevée par l'intervention de la ligase. Lors de la seconde réplication, les chaînes filles reconstruites peuvent servir de modèles fonctionnels pour la synthèse de nouvelles chaînes. Ainsi, les défauts ne sont jamais éliminés des chaînes lésées, mais celles-ci se trouvent progressivement "diluées" [57,62] au fur et à mesure des réplications.

Notons enfin que dans certains cas (cellules de mammifères), les espaces produits dans les chaînes filles après la première réplication pourraient être reconstitués, non par recombinaison, mais directement par une synthèse *de novo* [95,104].

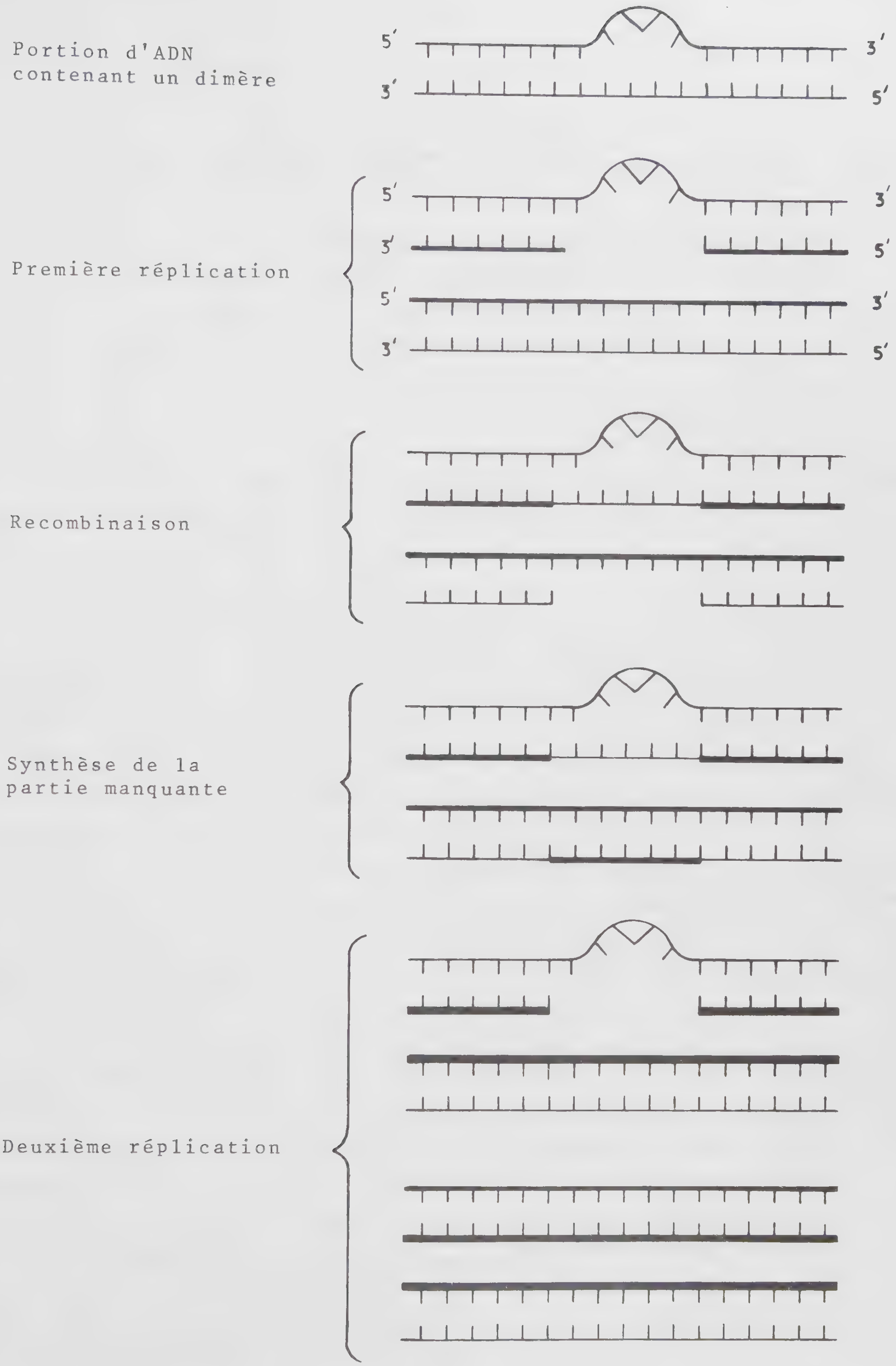


Fig. I-4 : MECANISME DE REPARATION PAR RECOMBINAISON.

I.6.3 - *Conclusion.*

La cellule offre de nombreuses possibilités de réparation des radiolésions du matériel héréditaire. Cette diversité peut paraître à la fois :

- utile , par exemple pour les celules de la peau qui se reproduisent constamment et qui sont soumises à de nombreuses agressions du milieu extérieur.
- surprenante pour la grande majorité des systèmes biologiques qui ne semblent pas subir de pressions de sélection de la part du milieu extérieur, et en particulier du rayonnement [91] : ainsi, la présence de l'enzyme de photorestauration dans des cellules qui ne voient jamais la lumière, ou la présence de la ligase (qui assure la jonction des cassures) chez tous les organismes, de la bactérie à l'homme, alors que les doses de radiations reçues naturellement n'excèdent pas 0,1 Rads par an.

En fait des explications simples peuvent être apportées : une molécule fragile comme l'ADN est soumise à de nombreux accidents ou erreurs durant la réplication ou la transcription [62] : des cassures de chaîne peuvent se produire, des bases erronnées peuvent s'introduire. Un bon équipement de réparation s'avère donc nécessaire pour assurer la continuité génétique.

Il ne faut pas commettre l'erreur de penser qu'une plus grande radiorésistance est directement et <u>uniquement</u> associée à un équipement enzymatique plus complet. Par exemple la résistance de certaines bactéries (*M. radiodurans*) est liée à la complexation d'une grande partie de leur ADN avec la membrane d'où une protection accrue [35].

Par ailleurs, il faut également bien noter que la réparation n'a pas un rendement égal à 100 % en qualité et quantité. Les erreurs commises dans cette réparation sont à l'origine des mutations, et par conséquent de l'évolution biologique (une réparation trop parfaite supprimerait l'évolution).

Pour terminer, signalons le lien qui a souvent été envisagé, mais jamais démontré, entre le vieillissement et une détérioration éventuelle des processus de réparation. Des travaux récents [65] montrent, par contre, une bonne proportionalité entre réparation et le logarithme de la durée de vie de différentes espèces.

CHAPITRE II

PARTIE EXPERIMENTALE : *MATERIEL ET METHODES*

II.1 - OBTENTION D'ADN MARQUE.

II.1.1 - *Généralités*.

Une souche bactérienne d'*Escherichia Coli*, auxotrophe en thymine, est cultivée en bouillon nutritif en fournissant de la thymine active ^{14}C marquée sur le méthyle.

II.1.2 - *Technique de culture*.

La souche utilisée est *Escherichia Coli* 15 $T^-A^-U^-$ (déficiente en thymine, arginine, uracile) conservée en gélose profonde.

Elle est cultivée dans le milieu M 63 de l'institut Pasteur enrichi en thymine, uracile, arginine ; d'où la composition globale suivante :

Sulfate d'ammonium	2g/l	A
Sulfate de magnésium	0,2g/l	A
Sulfate ferreux	0,5mg/l	A
Phosphate monopotassique	13,6g/l	A
Arginine	0,2g/l	A
Uracile	0,2g/l	A
Thymine inerte	5mg/l	A
Thymine marquée	80µCi/l	A
Glucose	4g/l	B

Le pH est ajusté à 7,2 par addition de potasse en solution concentrée. Le milieu est ensuite stérilisé de la manière suivante : la fraction A est autoclavée à 120°C pendant 20 minutes. La fraction B (volume minimum ramené à pH = 7,2) est autoclavée séparément à 110°C pendant 10 minutes, puis ajoutée sous conditions stériles à la solution A.

L'obtention de bactéries dont l'ADN est marqué se passe en deux temps :

- Une préculture est d'abord effectuée : 50 ml de milieu sans thymine marquée sont ensemencés à partir d'un prélèvement de gélose puis incubés à 37°C, dans un erlenmeyer, avec agitation légère. La fin de la période de croissance logarithmique est décelée par des mesures de densité optique sur des prélèvements aliquotes de préculture (comparaison avec une courbe étalon).

- La culture proprement dite (10 litres de milieu avec thymine marquée) est alors ensemencée par addition sous conditions stériles de 10 à 20 ml de préculture. L'incubation a lieu dans un fermenteur à la température de 37°C, sous légère surpression d'oxygène. Le développement s'effectue durant une nuit (environ 10 heures).

Contrôle de l'auxotrophie de la souche.

Un prélèvement de la préculture est étalé sur deux types de gélose :

le type I contenant le milieu habituel complet

le type II contenant le milieu habituel sans thymine.

Après incubation à 37°C pendant une nuit, notre mutant $T^-A^-U^-$ de *E. Coli* doit apparaître normalement sur le type I, alors qu'il doit être dans l'impossibilité de former des colonies sur le type II.

II.1.3 - *Extraction de l'ADN.*

La méthode utilisée est celle de MARMUR /106/ qui consiste à précipiter sélectivement l'ADN après lyse cellulaire, élimination des protéines et digestion de l'ARN par la RNase. Les étapes en sont les suivantes :

Le bouillon de culture en phase plateau est centrifugé avec une super-centrifugeuse SHARPLES à 40 000 tours/minute (soit environ 50 000 g). Le poids humide de cellules obtenu est de l'ordre de 20 à 25 grammes.

Les cellules ainsi récupérées sont lavées avec 400 ml de NaCl 0,15 M/EDTA 0,1 M/pH = 8 (dans lesquels elles sont remises en suspension), puis centrifugées à 8000 tours/minute pendant 10 minutes. Le culot bactérien est remis en suspension dans 200 ml de NaCl/EDTA. La paroi cellulaire est alors détruite (lyse) par addition de 20 ml de

de sodium dodécyl sulfate à 25 % (qui dénature en même temps quelques protéines). Le mélange est porté à 60°C (bain-marie) pendant 10 minutes sous légère agitation. Après refroidissement à température ambiante, la molarité du mélange est ajustée à 1 M en perchlorate par addition de 55 ml de perchlorate de sodium 5 M (qui dissocie protéines et acides nucléiques). Une première déprotéinisation du mélange est effectuée par addition d'un égal volume, soit 275 ml, de solution chloroforme-alcool isoamylique (24:1 v/v) et agitation pendant une demi-heure dans un erlenmeyer à col rodé et bouché (l'alcool isoamylique est utilisé comme antimousse). La centrifugation du mélange à 5000 tours/mn pendant 1 heure fait apparaître trois phases : la phase supérieure contenant les acides nucléiques, une phase centrale (anneau blanc) contenant les protéines, et la phase inférieure contenant les autres constituants de la cellule. La phase supérieure de volume V est prélevée, et l'addition d'un volume 2V d'éthanol (environ 600 ml) provoque la précipitation des acides nucléiques. L'addition de quelques ml supplémentaires d'alcool confirme que la précipitation est totale. Les acides nucléiques sont récupérés par enroulement sur une baguette de verre, et l'excès d'alcool est éliminé par de légères pressions contre la paroi du récipient. Les acides nucléiques sont alors mis en suspension dans 200 ml de NaCl 0,015 M/citrate de sodium 0,0015 M (solution dite *diluée*), par barbotage d'air. Puis la molarité du mélange est ajustée à 0,15 M/ 0,015 M/pH ≃ 7 (concentration dite *normale*) par addition de 20 ml de NaCl 1,5 M/citrate 0,15 M (solution dite *concentrée*). Cette dernière solution est soumise à un autre cycle de déprotéinisation (action de $CHCl_3$,..etc ...). L'opération est répétée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de protéines à l'interphase du mélange centrifugé. Après la dernière précipitation à l'éthanol, les acides nucléiques sont mis en solution dans 180 ml de NaCl/citrate *dilué*, et le mélange est soumis à l'action de 4,5 ml de ribonucléase à 0,2 % dans NaCl 0,15 M/ pH = 7 (digestion de l'ARN) par incubation à 37°C pendant trente minutes sous légère agitation. La molarité de la solution est alors ajustée à la concentration *normale* par addition de 18,5 ml de NaCl/ citrate *concentré* et le mélange est soumis à un dernier cycle de déprotéinisation (205 ml de $CHCl_3$). L'ADN contenu dans le surnageant est alors précipité à l'éthanol puis mis en suspension dans 81 ml de NaCl/citrate *dilué* auxquels on ajoute 9 ml d'une solution de CH_3COONa 3 M/EDTA 0,001 M/pH = 7 (mélange qui ajuste la concentration ionique nécessaire en vue de la précipitation terminale).

L'ADN est alors précipité sélectivement par addition, en petites fractions, de 50 ml d'alcool isopropylique. L'ADN s'enroule sur la tige de verre. Après séchage pendant plusieurs heures, le poids d'ADN ainsi isolé est d'environ 25 mg avec un taux de marquage de l'ordre de 0,7 µCi/mg.

II.1.4 - Conservation de l'ADN.

L'ADN ainsi isolé peut être stocké à -20°C pendant plusieurs jours, voire une à deux semaines. Toutefois, à cause du marquage une certaine autoradiolyse est inévitable. De ce fait, le temps de stockage doit être le plus restreint possible et un traitement est indispensable avant chaque utilisation (Cf. II.2.1).

II.1.5 - Contrôle de la nativité de l'ADN.

Dans ce but, les densités optiques à 260 nm de deux solutions, l'une contenant de l'ADN natif, l'autre du même ADN volontairement dénaturé, sont mesurées. La technique est la suivante :

10 ml d'une solution d'ADN à la concentration 0,05 mg/ml sont préparés par dilution 10 d'une solution mère à 500 mg/l. Une partie de la solution est utilisée telle qu'elle pour l'enregistrement du spectre UV entre 320 et 220 nm. La D.O. du pic d'absorption à 260 nm est notée. Le restant de la solution est chauffé à 100°C pendant 25 minutes sous reflux, puis refroidi brusquement en le plongeant dans un mélange de glace pilée et de sel : la dénaturation ainsi obtenue est totale. Comme précédemment le spectre UV est enregistré et la $D.O._{260}$ notée.

II.2 - IRRADIATION DE L'ADN.

II.2.1 - Traitement avant irradiation.

Une élimination des nucléosides et nucléotides qui auraient pu se libérer par autoradiolyse lors du stockage est effectuée en procédant comme suit :

L'ADN subit deux lavages au méthanol suivis de deux centrifugations pour éliminer les eaux de lavage. Il est alors mis en solution dans de l'eau permutée à la concentration de 500 mg/litre. La mise en suspension est facilitée par un barbotage d'air : cette méthode

est plus efficace qu'une simple agitation et les risques de cassure de chaîne entraînés sont moindres. Une dialyse est effectuée contre de l'eau tridistillée pendant 16 heures à 0°C.

Dans le cas d'une mise en solution de l'ADN dans un tampon (qui sera décrit le moment venu), la dialyse est effectuée contre le même tampon.

Cette dialyse complète l'action du méthanol et élimine toutes traces de celui-ci (les alcools sont des capteurs de radicaux $OH^{\cdot}$). La solution récupérée dans le sac à dialyse est prête à l'emploi.

II.2.2 - *Conditions d'irradiation.*

II.2.2.1 - *Généralités.*

L'irradiateur utilisé est constitué par trois sources de ^{60}Co de 2000 curies chacune, disposées suivant les sommets d'un triangle équilatéral, au fond d'une piscine. Divers emplacements, fixes par rapport aux sources, constitués de conduits cylindriques, sont destinés à recevoir les capsules d'irradiation. Une épaisseur de quatre mètres d'eau à 15°C assure la protection biologique.

L'intensité du rayonnement γ est évalué par la méthode de FRICKE /56,174/ (dosimétrie au sulfate ferreux) ou par la méthode de DESCOURS-RASSAT /40/ (spectre RPE des radicaux libres créés dans l'alanine). Au centre de l'irradiateur où le flux est homogène, la valeur du débit de dose est $6{,}04.10^{3}$ rads/mn (mesure effectuée le 12/5/74).

Les capsules à irradier sont constituées d'un cylindre en acier inoxydable de 55 mm de diamètre et de 300 mm de hauteur. A l'une des extrémités vient se visser un couvercle contenant un joint en caoutchouc assurant l'étanchéité. Une corde fixée au couvercle permet la mise en place de la capsule au fond de la piscine. Il existe deux types de capsule dont nous reparlerons dans les paragraphes suivants.

L'eau utilisée pour la préparation des solutions est tridistillée : tout d'abord sur permanganate de potassium, puis en présence d'acide phosphorique et enfin sans adjuvant.

II.2.2.2 - *Irradiation en milieu aéré.*

Le couvercle du type de capsule utilisé comporte deux orifices sur lesquels sont soudés deux tuyaux en caoutchouc, l'un assurant l'arrivée du gaz utilisé pendant l'irradiation (en l'occurence de l'air dans le cas présent), l'autre assurant le départ du

même gaz. Une tige de verre, solidaire du 1er orifice et plongeant dans la solution à irradier, assure son aération par l'arrivée et le barbotage de l'air pulsé depuis l'extérieur de la piscine par une pompe d'aquarium (débit : 1 à 2 bulles par seconde).

II.2.2.3 - *Irradiation en milieu désaéré.*

La solution à irradier peut être désaérée selon deux méthodes :

- soit par circulation de gaz inerte (argon, azote) avant ou pendant l'irradiation,
- soit par dégazage sous vide (technique bien supérieure à la précédente), réalisée de la façon suivante :

La solution est placée dans une ampoule spéciale. Elle est congelée par immersion du tube dans l'azote liquide, et maintenue congelée pendant l'établissement à l'intérieur du tube d'un vide de 10^{-5} mm de mercure. Une fois atteint, ce vide est maintenu en phase statique. Le tube est alors réchauffé tout doucement jusqu'à décongélation complète de la solution. Un tel cycle d'opération est répété 4 ou 5 fois, puis le tube est scellé sous vide à la flamme du chalumeau air-oxygène. L'ampoule scellée est placée dans un type de capsule dont le couvercle ne présente aucun conduit de circulation de gaz.

II.2.2.4 - *Etudes cinétiques.*

La formation des produits de coupure directe de la liaison glycosylamine en fonction du temps est étudiée par irradiation de fractions de 2 ml d'une solution d'ADN à 500 mg/l (soit 1 mg) aux doses suivantes : 0 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 ; 300 ; 500 Krads.

Les produits de radiolyse sont extraits de chaque échantillon selon la méthode décrite ci-dessous.

II.2.2.5 - *Etude de l'effet de dilution.*

A partir de la solution mère d'ADN à 500 mg/l obtenue en II.2.1 est réalisée une série de dilutions : 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16. Chacun des cinq échantillons est irradié à 300 Krads en quantité

égale à 1 mg, ce qui correspond respectivement aux volumes : 2, 4, 8, 16, 32 ml. Les solutions irradiées sont divisées en deux fractions égales (contenant donc chacune 500 µg d'ADN) :

La première fraction est traitée suivant la méthode d'analyse des produits d'élimination de la chaîne polynucléotidique (Cf. II.2.3).

La deuxième fraction est traitée suivant la méthode d'étude des produits de la chaîne (Cf. II.3.1) mais sans élimination des produits de rupture directe.

II.2.2.6 - *Etude de l'effet de sel.*

Deux sels ont été testés : chlorure de sodium et tampon phosphate sous les conditions expérimentales suivantes :

Comparaison H_2O/phosphate. Une fraction de la solution mère d'ADN à 500 µg/ml est diluée par de l'eau tridistillée de façon à obtenir une concentration finale de 62,5 µg/ml. L'autre fraction de la solution mère est diluée à 62,5 µg/ml également par addition d'un volume adéquat de tampon phosphate Na_2HPO_4 10^{-3}M/NaH_2PO_4 10^{-3}M/pH = 7. Les deux fractions diluées sont respectivement dialysées contre de l'eau tridistillée et du même tampon phosphate. Des fractions de 4 ml (soit 250 µg) de solution aqueuse d'ADN sont irradiées en conditions aérées à des doses de 0,30 et 300 Krads. La solution saline d'ADN est traitée de façon identique. Les six échantillons sont soumis à l'hydrolyse formique, après évaporation à sec et sans élimination des produits d'exclusion de la chaîne, selon le protocole décrit en II.3.1.

Comparaison H_2O/NaCl. Le mode opératoire utilisé lors de ce test est identique au précédent aux différences suivantes près :

- pas de dilution de la solution mère
- volume irradié 2 ml (soit 1 mg ADN)
- les produits de coupure directe sont éliminés avant hydrolyse.

II.2.3 - *Traitement après irradiation.*

Ce traitement a pour but la séparation des produits éliminés de la chaîne et de la chaîne d'ADN elle-même. Il peut être effectué de deux façons différentes.

a) Dans le cas d'une étude qualitative, et de façon plus générale dans le cas de quantités relativement importantes d'ADN, nous effectuons une dialyse de l'ADN irradié en procédant comme suit :

La solution irradiée est évaporée à sec à l'évaporateur rotatif. Le résidu est mis en contact pendant une nuit avec un excès de méthanol sous légère agitation. Un centrifugation est ensuite effectuée :

- Le surnageant (contenant une fraction importante des produits de rupture directe) est évaporé à sec et conservé (il sera ultérieurement soumis à l'analyse chromatographique (Cf. II.4).
- Le culot d'ADN est dissous dans un volume V d'eau tridistillée donnant une concentration de 500 mg/l. Il est alors dialysé pendant une nuit. Cette dialyse débarrasse l'ADN des dernières traces de produits de coupure ; l'ADN récupéré est prêt à être hydrolysé (Cf. II.3.1).

Remarque : Le contenu du sac à dialyse peut être évaporé à sec, et le résidu obtenu repris par un volume V d'eau tridistillée. En effet, on admet généralement que le volume de liquide à l'intérieur du sac varie entre le début et la fin de la dialyse. En fait, cette variation est extrêmement faible ; nous pouvons éventuellement tenir compte de ce phénomène d'après les mesures de radioactivité effectuées à chaque étape.

b) Pour des quantités faibles d'ADN, comme c'est le cas lors d'études quantitatives (cinétique d'irradiation), le traitement consiste en une série de lavages effectués comme suit :

La solution irradiée est évaporée sous vide jusqu'à siccité. Le résidu obtenu est mis en contact avec un excès d'acétone, sous légère agitation, pendant quelques heures (de une à deux heures, jusqu'à 16 heures : Cf. Discussion). Une centrifugation, dont la durée peut également être extrêmement variable, est ensuite effectuée. Le surnageant est prélevé et évaporé à sec ; le culot est repris par le même volume d'acétone que précédemment. Une nouvelle mise en contact sous légère agitation est effectuée pendant une demi-heure à une heure, suivie d'une centrifugation à 5000 tours/minute. Le surnageant est adjoint au précédent et conservé. Un troisième lavage à l'acétone sur le culot, également suivi d'une centrifugation, peut éventuellement être effectué.

Les surnageants rassemblés seront chromatographiés ultérieurement. Le ou les culots d'ADN sont dissous dans un volume d'eau permutée tel que l'on ait une concentration de 500 mg/l. L'ADN peut alors être soumis à l'hydrolyse (Cf. II.3.1).

c) *Discussion.*

- Le premier type de traitement présente l'avantage d'éliminer de façon absolue toutes traces de produits d'exclusion directe. Cependant, il paraît difficilement envisageable pour des échantillons nombreux, surtout s'ils représentent une faible quantité d'ADN : ainsi, lors d'une étude (sous l'angle hydrolytique) de l'irradiation en fonction du temps, un tel processus expérimental, outre sa difficulté de mise en oeuvre, impliquerait probablement des erreurs par suite de pertes inévitables lors de la récupération du contenu du sac. Par contre, il convient parfaitement pour un seul échantillon représentant une quantité relativement importante d'ADN destinée à des hydrolyses "qualitatives".

Notons que l'efficacité de la dialyse peut être vérifiée en effectuant un *témoin de dialyse*. Il consiste en une reprise au méthanol d'un ADN dialysé, suivie d'une chromatographie. Cette dernière doit être vierge de toute révélation autoradiographique.

- Le deuxième type de traitement essaie d'éliminer au mieux les produits de coupure par une série de reprises à l'acétone. Dans cette méthodologie, ce solvant est plus approprié que le méthanol dans la mesure où il extrait difficilement mais sélectivement les produits du type base modifiée, tandis que le méthanol, moins sélectif entraîne toujours plus ou moins des oligonucléotides.

Il est intéressant d'avoir des produits de coupure exempts de tels nucléotides et oligonucléotides pour une meilleure résolution chromatographique.

La durée du lavage doit être aussi importante que possible car nous avons pu constater que cela facilite la solubilisation. Ceci s'explique car l'acétone est un médiocre solvnat des pyrimidines par rapport au méthanol. Il semble qu'un premier lavage de 12 à 16 heures suivi d'un deuxième beaucoup plus court (30 à 60 minutes) soient d'une bonne efficacité. En effet, nous avons pu constater que dans ces conditions, la quantité de produits extraite lors d'un troisième lavage éventuel devenait totalement négligeable.

La durée de la centrifugation à 5000 tours/mn qui suit un lavage est très aléatoire. Dans un premier temps elle est appréciée de façon essentiellement visuelle. En effet, la faculté de l'ADN irradié à sédimenter peut être extrêmement variable. Tantôt vingt à trente minutes seront suffisantes pour une parfaite sédimentation, tantôt il faudra plusieurs heures pour que disparaissent complègement certains filaments d'ADN en suspension dans le solvant d'extraction et visibles à l'oeil nu.

Dans tous les cas, l'état d'avancement de l'extraction comme celui de la centrifugation peuvent à tout moment être chiffrés par mesure de la radioactivité de prélèvements aliquotes effectués à chaque stade du processus expérimental.

- Nous pouvons émettre quelques remarques d'importance quant à la verrerie employée.

Dans le cas d'une étude essentiellement qualitative (et par conséquent passant en principe par le stade dialyse), l'irradiation peut être effectuée dans n'importe quel récipient.

Par contre, lors d'une étude cinétique il est bon, dans la mesure du possible d'utiliser des tubes pouvant être centrifugés, pouvant être adaptés à l'évaporateur rotatif et pouvant être fermés hermétiquement. Ainsi, un échantillon pourra t'il être irradié, évaporé, lavé, agité, centrifugé dans un même tube, ce qui minimise (tout au moins à ce stade de la manipulation) au mieux les pertes, toujours nuisible pour des mesures quantitatives.

II.3 - HYDROLYSE DE LA CHAINE.

II.3.1 - *Hydrolyse acide.*

II.3.1.1 - *Matériel.*

L'hydrolyse est effectuée dans des ampoules comportant une partie renflée au bout d'un col de 10 cm de longueur et 0,8 cm de diamètre. Celles-ci sont scellées après introduction des réactants.

L'introduction d'un liquide à l'intérieur de ces ampoules s'effectue de préférence à l'aide d'une seringue à l'extrémité de laquelle est placée une canule de longueur au moins égale à celle du col de l'ampoule. En effet, l'introduction à l'aide d'une pipette graduée par l'orifice du col de l'ampoule s'avère extrêmement difficile, le liquide ayant tendance à refouler.

Le scellement s'effectue par chauffage à la flamme du chalumeau air-oxygène, au tiers (approximativement) de la hauteur du col.

La mise en température de l'ampoule scellée a été effectuée dans une cuve thermostatée à l'intérieur de laquelle la régulation est effective au dixième de degré.

II.3.1.2 - Méthode.

L'ADN irradié, débarrassé de ses produits de rupture directe, et en solution dans l'eau à la concentration de 500 mg/l, est introduit dans l'ampoule.

Les hydrolyses sont effectuées sur des quantités pondérales d'ADN variant entre 0,5 et 1 mg. La quantité choisie est mesurée par pipetage du volume correspondant de solution. Le contenu de l'ampoule est alors évaporé à sec. Le résidu obtenu est mis en contact avec un excès d'acide (0,5 ml à 6 ml d'acide formique ou autre selon les essais), et la solution est congelée par immersion dans l'azote liquide pour éviter tout début d'hydrolyse à température ambiante. L'ampoule est scellée selon la technique décrite *(vide supra)*, et plongée dans le bain thermostaté à la température T (variable entre 0 et 175°C selon les essais). La durée de l'hydrolyse (variable entre 0 et 48 heures) est également liée à la nature des essais effectués. Lorsque le temps est écoulé, la réaction est bloquée par immersion de l'ampoule dans l'azote liquide.

Après décongélation et ouverture de l'ampoule, la solution est prélevée de la même façon qu'elle a été introduite. Elle est transférée dans un ballon ou un tube dans lequel on ajoute les quelques ml d'acide utilisés pour le rinçage de l'ampoule. Ces fractions acides sont évaporées sous vide. Le résidu résultant est repris une ou deux fois par un peu d'eau et soumis à une nouvelle évaporation à sec. Le résidu obtenu, de couleur généralement brune, est alors lyophilisé pendant 1 heure environ, sous un vide de 10^{-3} torr, pour éliminer les dernières traces éventuelles d'acide. Nous verrons que cette technique d'élimination n'est pas valable pour tout acide (Cf. Discussion).

Après lyophilisation, l'ADN hydrolysé est mis en contact avec un volume d'acétone de l'ordre de 5 ml, pendant une nuit sous

légère agitation. Le mélange est ensuite centrifugé à 5000t/mn pendant 20 à 30 minutes. Le surnageant est prélevé, évaporé jusqu'à siccité et conservé. Le culot est repris par 5 ml d'acétone, laissé en contact pendant une trentaine de minutes, puis est centrifugé à 5000 tours/mn. Le surnageant est adjoint au précédent et soumis à une évaporation dont le résidu, contenant les produits de radiolyse éliminés de la chaîne par l'hydrolyse, est alors repris par 100 à 400 µl de méthanol. Une fraction connue de ce volume est soumise à l'analyse chromatographique (Cf. II.4).

II.3.1.3 - Discussion.

Il convient d'émettre quelques remarques au sujet de ce protocole expérimental et d'y apporter quelques modifications le cas échéant.

La première partie de la méthode précédemment décrite convient essentiellement pour une quantité relativement importante d'ADN et par la même pour une étude qualitative. Dans le cas d'une étude de l'irradiation en fonction du temps il peut être beaucoup plus judicieux de procéder ainsi : après le dernier lavage à l'acétone de l'ADN irradié (Cf. II.2.3-b), le culot de centrifugation est repris une première fois par un volume V/2 d'acide (si le volume de l'hydrolysat est V) et transféré dans l'ampoule ; une deuxième reprise par un volume V/2 acide est effectuée afin d'entraîner les traces d'ADN résiduelles, et cette fraction est adjointe à la précédente dans l'ampoule. Le scellement peut alors être effectué.

Une autre variante de cette technique est utilisée dans le cas d'une cinétique d'irradiation suivie d'une hydrolyse effectuée sur l'ADN irradié non débarrassé de ses produits de coupure. L'irradiation est alors effectuée directement dans l'ampoule où aura lieu l'hydrolyse. La solution irradiée est évaporée à sec et l'acide est alors directement introduit dans l'ampoule selon la technique décrite.

En ce qui concerne l'élimination de l'acide après hydrolyse, la technique de lavage à l'eau suivie d'une lyophilisation sous vide de 10^{-3} torr est valable essentiellement pour l'acide formique et, dans une moindre mesure, pour l'acide chlorhydrique. Les autres acides doivent être neutralisés après hydrolyse selon un processus expérimental souvent lourd et rempli d'embûches (pertes énormes en radioproduits). C'est une des raisons pour lesquelles ces acides ont été abandonnés et aussi n'entrerons nous pas dans la description du processus expé-

expérimental en question.

Signalons pour terminer qu'un produit non dégradable dans nos conditions d'hydrolyse (uracile $^{14}C_2$ ou adénine $^{14}C_8$ peut être ajouté en quantité connue à la solution mère d'ADN avant hydrolyse pour pouvoir chiffrer le rendement et la reproductibilité de la méthode. A cet effet, comme cela a déjà été indiqué, des prélèvements aliquotes sont effectués aux divers stades du processus et comptés en scintillation liquide.

II.3.2 - *Hydrolyse enzymatique*.

II.3.2.1 - *Généralités*.

L'ADN Irradié n'est pas hydrolysé par une enzyme particulière, mais est soumis à l'action d'un broyat cellulaire d'*Escherichia coli*, donc d'un système multienzymatique.

II.3.2.2 - *Préparation de l'ADN*.

Il s'agit là d'une variante du traitement post-irradiatoire décrit en II.2.3.

L'ADN irradié est soumis à un lavage au méthanol pendant une nuit, suivi d'une centrifugation à 5000 tours/minute. Le culot d'ADN est dissous dans un tampon phosphate pH = 7,5 à la concentration de 1 mg/3 ml. La solution tampon est préparée à partir d'une solution de phosphate dissodique 0,05 M/pH = 9 dont le pH est ajusté à 7,5 par addition d'un volume adéquat de solution de phosphate monosodique 0,5 M/pH = 4. La solution d'ADN est alors dialysée pendant 16 heures contre le même tampon phosphate que celui utilisé pour la dissolution. Le contenu du sac à dialyse est récupéré et conservé.

II.3.2.3.- *Préparation de l'extrait enzymatique*.

Une culture d'*E. coli* de 500 ml est effectuée selon le protocole expérimental décrit en II.1.2. 350 ml de cette culture sont centrifugés à 5000 tours/mn pendant 20 minutes. Le surnageant est éliminé. Le culot cellulaire est remis en suspension dans une solution de KCl 0,15 M puis centrifugé. Ce lavage est suivi de deux autres effectués dans les mêmes conditions. Après la dernière centrifugation, les celules sont remises en suspension dans 6 ml de KCl 0,15 M et ultrasonnées pendant 30 secondes (intensité = 50). La suspension cellulaire

est alors centrifugée à 5000 tours/mn pendant une heure. Le surnageant est récupéré et conservé à -20°C pendant un minimum de temps, à défaut de ne pouvoir être utilisé immédiatement.

II.3.2.4 - Hydrolyse proprement dite.

Chaque essai est effectué sur 2,5 ml de solution d'ADN dialysée soit environ 800 µg. Aux 2,5 ml sont ajoutés 0,5 ml d'une solution de $MgCl_2$ à 0,5 mg/ml (solvant = tampon phosphate pH = 7,5). Les échantillons sont préincubés 15 minutes à 37°C avant l'addition de 1 ml d'extrait enzymatique. Une incubation d'une heure est alors effectuée à 37°C sous agitation. La réaction est arrêtée par immersion des tubes dans de l'eau à 90°-100° pendant une minute. Les tubes sont alors centrifugés à 5000 tours/mn pendant 30 minutes. Le surnageant est évaporé à sec. Le résidu obtenu est mis en contact avec 2 ml d'acétone pendant une vingtaine de minutes sous agitation, puis centrifugé. Le surnageant est prélevé et évaporé. Le culot est repris une deuxième fois par l'acétone, laissé en contact quelques minutes, puis centrifugé. Ce dernier surnageant est adjoint au précédent et évaporé jusqu'à siccité. Le résidu résultant peut alors être soumis à l'analyse chromatographique après dissolution dans quelques dizaines de µl du méthanol.

II.3.2.5 - Discussion.

Ce processus expérimental, s'il a permis l'identification qualitative des principaux produits de radiolyse portés par la chaîne d'ADN irradiée en conditions désaérées, ne saurait être considéré comme définitif. Des améliorations devront y être apportées avant qu'il ne trouve une forme définitive, permettant éventuellement des études quantitatives (étude cinétique).

Signalons la nécessité d'effectuer un *blanc* pour chaque essai enzymatique.

De la même manière que celle vue pour l'hydrolyse acide, un *témoin de dialyse* permet de contrôler l'efficacité de cette dernière.

II.3.3 - Etudes cinétiques.

La cinétique de formation des produits de radiolyse de l'ADN non éliminés de la chaîne polynucléotidique au cours de cette irradiation est étudiée par la voie hydrolytique.

Des fractions de solution d'ADN contenant en général une quantité de l'ordre de 500 µg (la concentration pouvant varier d'une manipulation à l'autre le cas échéant) sont irradiées à des doses s'échelonnant entre 0 et 300 Krads. Les produits de coupure directe sont éliminés en tenant compte des remarques émises dans la discussion du II.2.3 afin de minimiser au mieux les pertes. La série de culots d'ADN est hydrolysée simultanément selon la technique décrite précédemment.

II.4 - SEPARATION DES PRODUITS DE RADIOLYSE.

II.4.1 - Chromatographie sur couche mince.

II.4.1.1 - Adsorbants.

Silice

Nous avons utilisé la silice MN Kieselgel N-HR/UV 254 (Macherey-Nagel) comme principal adsorbant.

Le gel est préparé par homogénéisation dans 155 ml d'eau bouillante, de 80 g d'adsorbant, et 10 ml d'eau froide dans lesquels on a préalablement dissous 2,4 g d'amidon. Le gel ainsi obtenu est étalé sur plaques de verre 20 cm × 20 cm à l'aide de l'appareil de revêtement automatique CAMAG, fournissant ainsi 10 à 12 plaques recouvertes d'une couche d'adsorbant d'épaisseur préréglée à 0,25 mm. L'amidon est un liant qui permet une meilleure adhérence de la silice sur la plaque de verre. Le séchage des plaques s'effectue pendant une nuit à température ambiante avant activation à 110°C pendant une heure.

Cellulose

Un adsorbant utilisé de façon moindre que la silice est la celulose MN 300/UV 254 (Macherey-Nagel) soit sous forme de plaques prêtes à l'emploi "MN Polygram" (film d'adsorbant de 0,1 mm d'épaissur recouvrant une feuille de plastique), soit plus couramment sous forme de plaques préparées au laboratoire. Ces dernières sont des plaques de verre sur lesquelles a été étalé le gel préparé par homogénéisation de 30 g de cellulose dans 200 ml d'eau froide.

Deux autres types de plaques prêtes à l'emploi ont été utilisées occasionnellement :

- cellulose DC Aluminium (MERCK)
- cellulose F (MERCK).

II.4.1.2 - *Systèmes de solvants.*

Les systèmes de solvants courramment utilisés présentent les caractéristiques suivantes :

I. *Chloroforme-Méthanol-Eau (4:2:1)* phase inférieure à laquelle on ajoute 5 % de méthanol. La durée de migration est de l'ordre de 1 h 30 sur silice.

II. *Acétate d'Ethyle-Isopropanol-Eau (75:8:5)*

II'. *Acétate d'Ethyle-Isopropanol-Eau (75:16:9)*
Les durées de développement sont de l'ordre de 1 h 15.

L'association des solvants I + II' en chromatographie bidimensionnelle a été décrite pour la séparation des nucléosides et de leur dérivés /18/.

Le solvant II résulte d'une modification du solvant II' qui a permis, par l'association I + II, une meilleure résolution de nos produits. Ces systèmes de solvants sont particulièrement intéressants en raison de la rapidité des migrations (permettant la séparation de produits instables) et de l'excellente dispersion des taches obtenue (Cf. figures III-1 et IV-1).

III. *n-Propanol-Eau (10:3)*

IV. *Isopropanol-Solution saturée de sulfate d'ammonium-Tampon phosphate 1 M (2:79:19).*

L'association des systèmes chromatographiques III/ et IV/ mis au point au laboratoire permet la séparation des produits de radiolyse de la thymine sur cellulose /154,161/.

V. *Chloroforme-Méthanol (90:10)*

V'. *Chloroforme-Méthanol (95:5)*

VI. *Acétate d'Ethyle-Isopropanol (98:2)*

VI'. *Acétate d'Ethyle.*

Les systèmes de solvants V' et VI' sont utilisés au laboratoire pour la séparation des nucléosides peu polaires dont les fonc-

tions hydroxyles sont acétylées /16,154/.

Les solvants V et VI résultent respectivement de modifications effectuées sur les solvants V' et VI'. L'association des deux systèmes ainsi modifiés nous a permis une meilleure dispersion des taches correspondant aux produits secondaires dérivés de l'hydrolyse formique, lesquels ont un comportement chromatographique dans les solvants I et II ($0,8 < R_f < 1$) voisin de celui des nucléosides acétylés.

Dans tous les cas les séparations chromatographiques, de type ascendant, sont effectuées dans des cuves DESAGA, dont l'atmosphère est préalablement saturée par le système de solvant servant au développement, et à une température ambiante de préférence voisine de 23°C.

II.4.2 - *Détection des produits.*

II.4.2.1 - *Introduction.*

La position chromatographique d'un composé dans un système de solvants est définie par sa valeur de R_f.

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le produit}}{\text{Distance parcourue par le front}}$$

La reproductibilité des R_f n'est pas toujours parfaite, en particulier sur silice (Cf. II.4.2.2).

II.4.2.2 - *Localisation par témoins chromatographiques.*

Tout dépôt d'un mélange de produits radioformés est accompagné d'un dépôt en microquantités (quelques µg) de témoins. Ce sont des produits commerciaux ou synthétisés au laboratoire, dont la position chromatographique est bien établie. Ils permettent ensuite d'émettre les premières hypothèses sur la nature des produits de radiolyse d'après leur position relative par rapport à ces témoins. Ils permettent également de pallier au manque de reproductibilité des R_f en effectuant une co-chromatographie d'un certain produit de radiolyse marqué et du produit de référence inerte, supposé correspondant : si l'on observe une coïncidence parfaite dans plusieurs systèmes de solvants, entre la révélation autoradiographique et la révélation du témoin, il est permis de penser que l'on est en présen-

ce de la même substance.

Deux mélanges de témoins réunis en solution ont été couramment utilisés.

Mélange n°1 : uracile, uridine, thymine, thymidine, fluoro-5 uracile, bromo-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine, acétyl-3' thymidine, di-acétyl-3',5' thymidine. (complété occasionnellement par : méthylène hydantoïne et bromo-5 isoamyloxy-6 dihydro-5,6 thymidine).

Mélange n°2 : urée-formylurée.

II.4.2.3 - *Détection des produits marqués au ^{14}C.*

Après migrations, les produits d'irradiation sont repérés par l'apparition sur film autoradiographique KODIREX, mis en contact avec la plaque, d'une tache noire due à l'impression du papier photographique par le rayonnement β émis par la substance radioactive (c'est dans cette optique que nous avons préparé de l'ADN marqué au carbone 14 sur le méthyl de la thymine).

II.4.2.4 - *Détection des produits témoins.*

Détection UV

Les substances possédant une double liaison éthylènique, et en particulier les pyrimidines portant la double liaison 5-6, sont localisés par examen du chromatogramme sous la lampe UV à 254 nm. C'est le cas des principaux composants du mélange de témoins N°1 (uracile, uridine, thymine, thymidine, fluoro-5 uracile). Certains dérivés pyrimidiques ayant leur double liaison 5-6 saturée manifestent également une certaine fluorescence s'ils sont présents en quantité suffisante (c'est le cas des autres composants du mélange de témoins n°1).

Détection chimique colorée

- le paradiméthylaminobenzaldéhyde (PDAB) en solution acido-alcoolique révèle les uréides (H_2N-CO-NH-R) en jaune /49/. C'est ainsi, en particulier, que sont révélés les composants du mélange de témoins N°2.

- le nitrate d'argent ammoniacal permet la détection des glycols de pyrimidine en les colorant en marron foncé /138/

- la pulvérisation du chromatogramme avec une solution alcoolique d'iodure de potassium fait apparaître une tache brune au niveau des peroxydes /149/.

- la dinitro-2,4 phénylhydrazine (DNPH) en solution acide colore les composés aldéhydiques et cétoniques en jaune /109/. C'est le cas du pyruvamide.

II.4.3 - *Analyse quantitative.*

Les plages de silice correspondant aux produits radioactifs localisés par autoradiographie sont détachées de leur support et recueillies dans un flacon de comptage. Une élution par 2 ml d'eau est effectuée pendant une nuit à 37°C. On complète avec 20 ml de mélange scintillant *Instagel* (produit commercial PACKARD) et l'ensemble est homogénéisé pendant 1 à 2 minutes au moyen d'un agitateur IKA-*Vibro-Fix*. Les flacons sont alors mis en comptage dans un appareil *Tricarb-2500* (PACKARD).

Le "quenching" est voisin de 0,54 ce qui correspond à un rendement de l'ordre de 70 % pour le ^{14}C, l'erreur statistique de comptage étant minimisée à 1 % par un préréglage adéquat du temps de comptage et du nombre global d'impulsions.

II.4.4 - *Purification des produits radioactifs commerciaux.*

Les produits radioactifs commerciaux d'activité spécifique élevée nécessitent la plupart du temps une purification préalable qui a pour but l'élimination de leurs produits d'autoradiolyse.

Cette purification est réalisée par chromatographie uni ou bidimensionnelle.

- La thymine $^{14}CH_3$ est chromatographiée sur cellulose F dans le solvant I.

- L'uracile $^{14}C_2$ est purifié de la même manière que la thymine.

- L'adénine $^{14}C_8$ est chromatographiée sur silice dans le solvant II.

II.5 - OBTENTION DES PRODUITS TEMOINS.

II.5.1 - *Produits commerciaux.*

La thymine, la thymidine et le fluoro-5 uracile, sont des produits FLUKA. L'uracile et l'uridine sont des produits MERCK. L'urée et la formylurée sont des produits ALDRICH. La dihydro-5,6 thymine est un produit SIGMA.

La thymine $^{14}CH_3$, d'activité spécifique 50 mCi/mM, a été fournie par le Département des Radioéléments de SACLAY (C.E.A)

II.5.2 - *Produits obtenus par synthèse.*

Les dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis* et *trans* ont été synthétisés suivant le procédé de BAUDISCH et DAVIDSON /6/ par bromation de la thymine suivie de l'action de l'oxyde d'argent.

L'acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique a été obtenu par action de l'eau oxygénée sur l'acide méthyl-5 barbiturique, synthèse décrite par DOUMAS /41/.

L'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne a été préparée par condensation de l'acide pyruvique et de l'urée selon la méthode décrite par MURAHASHI et coll. /112,160/.

La Formyl-N pyruvyl-N' urée est obtenue par oxydation periodique du glycol de thymine suivant la méthode proposée par TEOULE et CADET /162/.

L'hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine résulte de la condensation de l'isocyanate de potassium avec l'ester éthylique de la méthyl-2 isosérine, synthèse décrite par NOFRE et coll. /115/.

L'hydroxy-6 dihydro 5-6 thymine est préparé par réduction de la bromohydrine de thymine par l'acide acétique et le zinc selon la technique décrite par NOFRE et OGIER /21,116/.

II.6 - CARACTERISATION DES PRODUITS DE RADIOLYSE.

II.6.1 - *Généralités.*

Les zones siliceuses correspondant aux taches marquées détec-

tées par autoradiographie, sont détachées de leur support et mises en suspension dans le méthanol. L'élution s'effectue par une homogénéisation de quelques secondes. L'ensemble est centrifugé à 5000 tours/mn pendant 5 minutes et le surnageant est filtré sur une membrane Solvinert (MILLIPORE) de porosité 0,45 µ (100 mesh) à l'aide d'une seringue. La solution méthanolique est évaporée jusqu'à siccité. Le résidu obtenu est mis au contact de quelques µg de la substance inerte correspondante et des réactifs qui vont permettre de le caractériser.

II.6.2 - Produits communs aux milieux aéré et désaéré.

II.6.2.1 - Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis*

Des traces de glycol *cis* radioactif d'irradiation auxquelles on ajoute 500 µg du même produit inerte [6], sont mises en contact pendant une heure à température ambiante sous agitation avec 1 ml de métaperiodate de sodium 0,2 M [162]. La solution est évaporée sous vide ; le résidu résultant est repris deux fois par 100 µl de méthanol et centrifugé deux fois pour éliminer un maximum de sels. Le surnageant est chromatographié sur silice dans les systèmes de solvants I + II en présence du mélange de témoins n°2. La plaque est ensuite mise en autoradiographie, après détection UV et révélation colorée au PDAB [49].

II.6.2.2 - Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *trans*

Les traces de glycol *trans* radioactif, diluées par 500 µg du même produit inerte, sont isomérisées [92,154] par incubation en solution aqueuse (∿ 1 ml) à 37°C pendant une nuit sous agitation constante. La solution, contenant les deux isomères en proportion 50/50 environ, peut alors être après évaporation, soit chromatographiée dans le système de solvants I + II, soit soumise à l'action du métaperiodate *(vide supra)*.

II.6.2.3 - Acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique.

500 µg d'acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique [41] et des traces du produit radioactif issu de la radiolyse sont mis en contact

avec 500 µl de solution alcaline à pH ≃ 9 (obtenu par addition de potasse) pendant une nuit à température ambiante sous agitation [41]. Le mélange réactionnel est approximativement neutralisé, évaporé à sec, et une fraction est soumise à l'analyse chromatographique sur plaque de cellulose dans les systèmes de solvants III + IV, en présence du mélange de témoins n°2. Une révélation colorée au PDAB [49], précédée d'une détection UV, est ensuite effectuée avant mise en autoradiographie de la plaque.

II.6.2.4 - *Hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne*.

Des traces d'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne radioactive issue de la radiolyse de l'ADN, diluées avec 500 µg du même produit inerte [112], sont chauffées à 100°C sous reflux avec 5 µl d'acide formique et 6 µl d'anhydride acétique, en présence de traces d'hydroquinone, pendant cinq minutes [112]. Après refroidissement, le mélange est évaporé jusqu'à siccité à l'évaporateur rotatif, puis repris par un peu de méthanol et déposé sur silice en présence du mélange de témoins n°1. L'élution s'effectue dans les systèmes de solvants I + II, puis est suivie d'une détection UV et d'une autoradiographie.

II.6.3 - *Produits spécifiques des conditions aérées*.

II.6.3.1 - *Pyruvamide*.

De la thymidine inerte est irradiée [16,23] en solution aqueuse aérée (2.10^{-4}M, pH = 7) pendant 60 minutes, ce qui correspond à une dose de 360 000 Rads. La solution est évaporée et le résidu repris par le méthanol.

Une première fraction de cette solution méthanolique est déposée sur silice et chromatographiée dans les solvants I + II. Une pulvérisation du chromatogramme à la dinitro-2,4 phénylhydrazine révèle le pyruvamide sous forme de son hydrazone [109] que l'on extrait au méthanol.

Les produits de radiolyse de l'ADN sont chromatographiés, en présence de la seconde fraction méthanolique précédemment citée utilisée comme témoin, dans les solvants I + II. Après révélation à la DNPH, la tache jaune qui apparaît est extraite au méthanol.

L'hydrazone inerte (de la 1ère plaque) et l'hydrazone radioactive (de la 2° plaque) sont chromatographiées sur plaque de silice GHR (Macherey-Nagel) [123], avec élution dans les solvants suivants :

VII. *Ether de pétrole-Formiate d'éthyle-Acide propionique (70:35:7,5)* [127].

VIII. *Benzène-Acide acétique (80:20)* [123].

La plaque est ensuite mise en autoradiographie.

II.6.3.2 - La formyl-N pyruvyl-N' urée.

La formyl-N pyruvyl-N' urée ^{14}C d'irradiation, sous forme de traces, est chauffée en solution aqueuse (∿ 1 ml) au bain marie (90°-100°C) sous reflux pendant 3 heures environ [162].

Le mélange est évaporé jusqu'à siccité ; le résidu est repris par un peu de méthanol et déposé sur silice en présence du mélange de témoins n°1. L'élution s'effectue dans le système de solvants I + II, puis est suivie d'une autoradiographie de la plaque.

II.6.4 - Produits spécifiques des conditions désaérées.

II.6.4.1 - Dihydro-5,6 thymine.

La dihydro-5,6 thymine radioactive à l'état de traces après dilution isotopique par 500 µg du même produit inerte, est mise en contact avec 1 ml de NaOH N pendant dix minutes à 100°C sous agitation. Le mélange réactionnel, après neutralisation par HCl, est évaporé sous vide. Le résidu obtenu est repris par 2 ml d'acétone, et le sel insoluble est éliminé par centrifugation à 5000 tours/mn pendant 5 minutes. Le surnageant, après évaporation et reprise par 100 µl de méthanol, est chromatographié sur cellulose dans les solvants III + IV, en présence du mélange de témoins n°1. La détection UV et la révélation colorée au PDAB [49] précèdent la mise en autoradiographie de la plaque.

II.6.4.2 - Hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine.

500 µg d'hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine de synthèse [115] et des traces de produit radioactif issu de la radiolyse sont mis en contact dans 1 ml de NaOH 5N pendant 10 minutes à 100°C sous agitation. Après refroidissement et neutralisation par HCl, le mélange réactionnel est évaporé à sec et repris 1 ou 2 fois par 2 ml d'acétone. La (ou les)

centrifugation(s) qui suit élimine le sel insoluble. Le surnageant est déposé sur cellulose et élué dans les systèmes de solvants III + IV. La pulvérisation de la plaque au PDAB /49/ est suivie d'une autoradiographie après séchage.

II.6.4.3 - *Hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine cis et trans*

Des traces du mélange des formes *cis* et *trans* de l'hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine marqué ^{14}C et 500 µg du produit témoin de synthèse /21,116/ sont soumis à l'action de 500 µl de H_2O_2 en présence de 5 µl de HCL concentré pendant 3 heures à température ambiante. La solution est évaporée jusqu'à siccité et lyophilisée. Le résidu résultant est repris par le méthanol et chromatographié sur cellulose D.C. Aluminium dans les solvants I + II. La révélation colorée des peroxydes à l'iodure de potassium /149/ est effectuée avant autoradiographie du chromatogramme.

1ère PARTIE

PRODUITS DE COUPURE DE LA LIAISON N-GLYCOSIDIQUE

CHAPITRE III

RADIOLYSE DE L'ADN EN SOLUTION AQUEUSE AEREE

III.1 - PRODUITS DE RADIOLYSE.

La radiolyse de l'ADN en solution aqueuse aérée conduit à la formation de dérivés plus ou moins stables.

Nous avons identifié les neuf substances majeures résultant de la rupture directe de la liaison glycosylamine /155,158/, la présence de certaines d'entre elles ayant déjà été suggérée par certains auteurs /63,64,107,166/. Il s'agit de (fig. III-1 et III-2) :

- thymine [1]
- dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis* et *trans* [3,4]
- acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique [6]
- hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne [5]
- formyl-N pyruvyl-N' urée [7]
- pyruvamide [2]
- formylurée [14]
- acétylurée [11]

La thymine est le produit prépondérant aux faibles doses. Aux fortes doses, son importance diminue et le pyruvamide devient prépondérant.

III.2 - IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES PRODUITS RADIOFORMES

III.2.1 - *Difficultés rencontrées.*

La quantité de produits modifiés libérée dans le milieu par irradiation est extrêmement faible. Par connaissance de l'activité spécifique de départ et des radioactivités récupérées pour

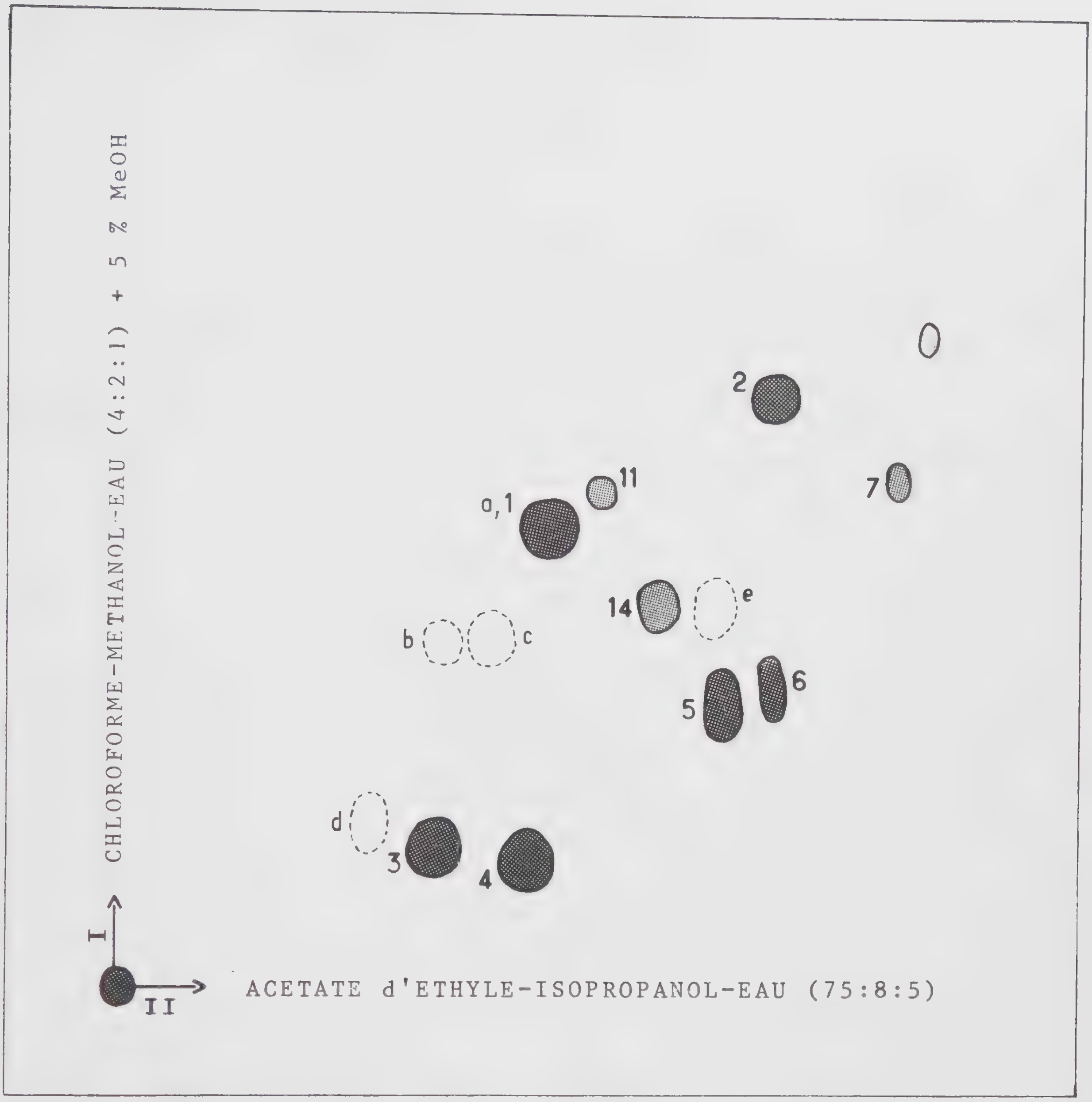
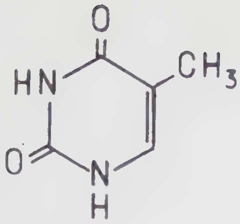


Fig. III-1 : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE SILICE MN-N-HR DES PRODUITS DE COUPURE DE LA LIAISON GLYCOSYLAMINE DE L'ADN IRRADIE EN SOLUTION AQUEUSE AEREE.

1 = thymine ; 2 = pyruvamide ; 3 = dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis* ; 4=dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *trans* ; 5 = hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne ; 6 = acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique ; 7 = formyl-N pyruvyl-N' urée ; 11 = acétylurée ; 14 = formylurée.

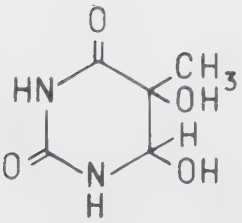
a = thymine ; b = thymidine ; c = uracile ; d = uridine ; e = fluoro-5 uracile.



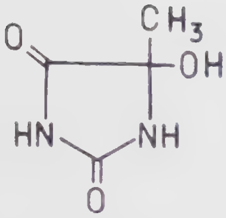
[1]

$H_2N-CO-CO-CH_3$

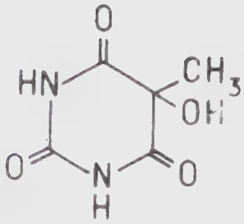
[2]



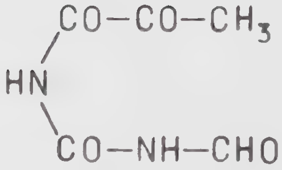
[3,4]



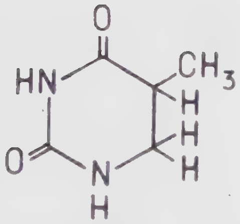
[5]



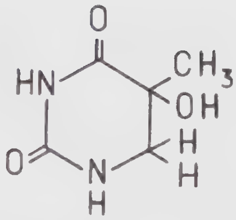
[6]



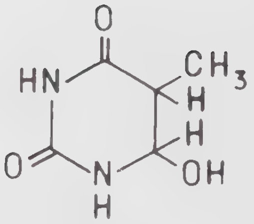
[7]



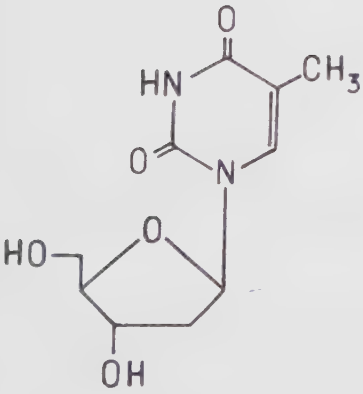
[8]



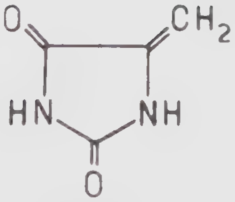
[9]



[10]



[19]



[12]

$H_2N-CO-NH_2$

[13]

$H_2N-CO-NH-CHO$

[14]

$H_2N-CO-NH-CO-CH_3$

[11]

Fig. III-2

1 = thymine ; 2 = pyruvamide ; 3 = dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis* ; 4 = dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *trans* ; 5 = hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne ; 6 = acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique ; 7 = formyl-N pyruvyl-N' urée ; 8 = dihydro-5,6 thymine ; 9 = hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine ; 10 = hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine ; 11 = acétylurée ; 12 = méthylène-hydantoïne ; 13 = urée ; 14 = formylurée ; 19 = thymidine.

les produits de radiolyse, un calcul simple nous a permis d'évaluer cette quantité à 10^{-8} — 10^{-10} grammes. Dans ces conditions, les méthodes spectroscopiques classiques de détermination de structure (IR,RMN,SM) couramment utilisées au laboratoire lors des travaux sur la thymine /154,159/ et la thymidine /16,23/ ne pouvaient être envisagées.

La séparation de ces produits par chromatographie sur couche mince (suivie d'une détection par autoradiographie) permet en outre de se faire une première idée de leur nature d'après leurs R_f, ou plus exactement par comparaison de leurs R_f avec les R_f de substances témoins inertes synthétisées et reconnues comme étant des produits de radiolyse de la thymine ou de la thymidine. Cependant une bonne correspondance dans les comportements chromatographiques (dans les deux systèmes de solvants) de la substance témoin et du produit de radiolyse supposé être cette substance témoin ne suffit pas à déterminer de façon non discutable le produit inconnu. Une caractérisation plus rigoureuse est nécessaire : nous avons eu recours à des microréactions spécifiques.

III.2.2 - *Thymine* [1]

C'est le premier produit qui apparaît lors des irradiations à faible dose (12500 Rads). Sa forte absorption UV sur le chromatogramme, à des R_f qui correspondent parfaitement à ceux du produit commercial (tableau I), la rend aisément identifiable.

Cette présence de thymine est en accord avec les résultats de précédents travaux /70,89/ et en particulier ceux de ULLRICH et HAGEN /166/ et HARIHARAN et CERUTTI /64/.

III.2.3 - *Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine cis* [3]

Les positions chromatographiques sur silice et sur cellulose donnent des R_f correspondant à ceux du produit de synthèse /6/ (tableau I). De plus, l'adjonction de mélange *cis-trans* inerte /6/ au point de dépôt du chromatogramme, et des révélations colorées au PDAB /49/ ou au nitrate d'argent /138/ apportent des preuves supplémentaires quant à la nature du produit par apparition d'une tache colorée en correspondance avec la tache autoradiographique.

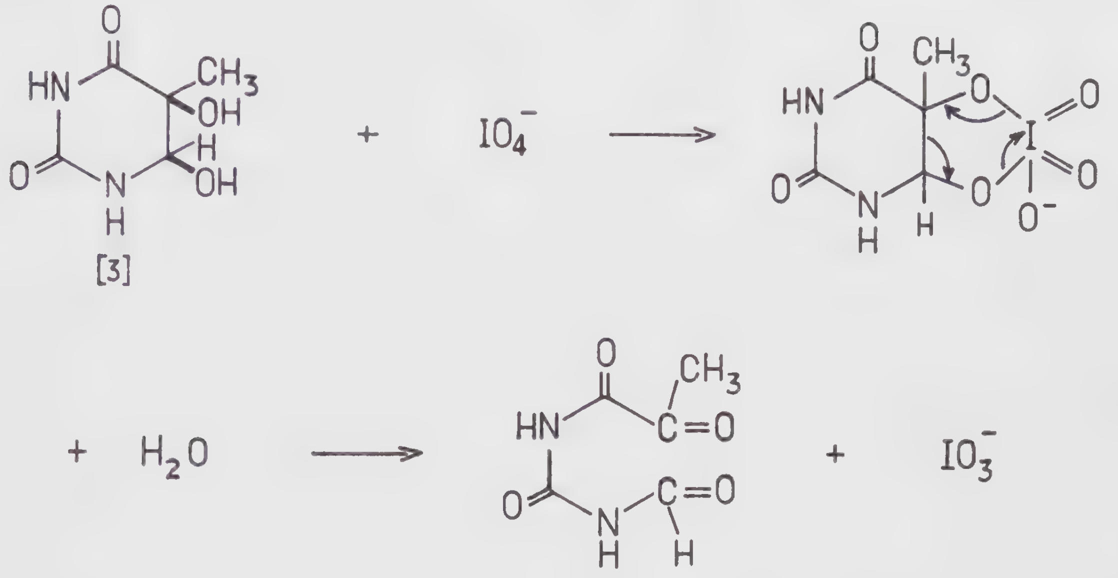
SUBSTANCES	1er système		2ème système	
	R_{f_I}	$R_{f_{II}}$	$R_{f_{III}}$	$R_{f_{IV}}$
Thymine [1]	0,56	0,53	0,70	0,56
Pyruvamide [2]	0,73	0,80	-	-
Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis* [3]	0,17	0,39	0,50	0,86
Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *trans* [4]	0,15	0,50	0,58	0,77
Hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne [5]	0,35	0,75	0,70	0,75
Acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique [6]	0,37	0,80	0,54	0,82
Formyl-N Pyruvyl-N' urée [7]	0,63	0,96	-	-
Dihydro-5,6 thymine [8]	0,60	0,43	0,70	0,49
Hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine [9]	0,34	0,40	0,60	0,72
Hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine [10a,10b]	0,35	0,49	0,60	0,68
Acétylurée [11]	0,61	0,60	-	-
Méthylène hydantoïne [12]	0,65	0,90	-	-
Urée [13]	0,13	0,12	-	-
Formylurée [14]	0,48	0,66	-	-
Thymidine [19]	0,42	0,37	-	-
Méthyl tartronylurée	-	-	0,27	0,79
Méthyl-2 Propionylurée	-	-	0,33	0,80
Hydroxy-2 méthyl-2 propionylurée	-	-	0,20	0,95

<u>TABLEAU I</u> : VALEUR DES R_f

1er système : Silice MN-N-HR ; I = Chloroforme-Méthanol-Eau (4:2:1) + 5 % MeOH ; II = Acétate d'éthyle-Isopropanol-Eau (75:8:5).

2ème système : Cellulose MN 300 ; III = Propanol-Eau (10:3) ; IV = Isopropanol-Solution saturée de sulfate d'ammonium-Eau (2:79:19).

La réaction au métaperiodate de sodium, caractéristique des α diols /162/, nous a permis d'identifier le glycol *cis* de thymine par sa transformation en formyl-N pyruvyl-N' urée.



[3]

[7]

Fig. III-3 : Oxydation periodique du glycol *cis* de thymine en formyl-N pyruvyl-N' urée.

Après réaction, chromatographie, révélation au PDAB et autoradiographie, la présence d'une tache marquée à l'emplacement coloré de la formyl-N pyruvyl-N' urée, ainsi qu'un reste de glycol *cis* nous permet de conclure sans ambiguité sur la nature du produit de départ.

II.2.4 - Dihydroxy-5-6 dihydro-5-6 thymine trans [4]

La comparaison des R_f avec ceux du produit témoin dans les deux systèmes de solvants et les révélations colorées restent valables. Les R_f son indiqués tableau I.

Le chauffage du glycol *trans* provoque l'isomérisation de ce dernier en forme *cis* /92,154/ selon une réaction semi-quantitative. Le mécanisme de celle-ci est probablement le suivant :

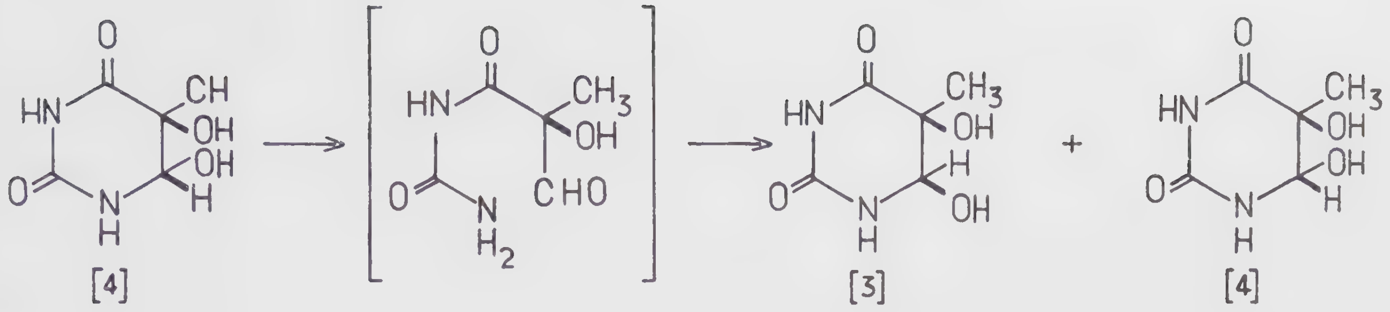


Fig. III-4 : Isomérisation du glycol *trans* en glycol *cis* de thymine.

La présence de deux spots autoradiographiques, l'un en position *cis*, l'autre correspondant à la fraction restée sous forme *trans*, est significative.

Le test au métaperiodate effectué sur le mélange *cis-trans* obtenu précédemment, en apportant une preuve sur la nature du produit issu de l'isomérisation, confirme par là-même, la caractérisation du produit initial.

III.2.5 - Acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique [6]

Il n'est en général pas isolé directement sur silice puisqu'il migre pratiquement au même niveau que l'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne (tableau I). Dans les rares cas où la séparation est effective, l'apparition de deux taches "jumelles" à des R_f correspondant à ceux du produit de synthèse /41/ est significative (fig. III-1). Le deuxième système de solvants (III + IV) sépare nettement les deux produits bien qu'il entraîne éventuellement une certaine dégradation de chacun d'eux. Les R_f sont ceux des produits inertes (tableau I).

L'acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique est caractérisé par le passage, en milieu basique, à la méthyl-tartronylurée selon la réaction décrite par DOUMAS et BIGGS /41/.

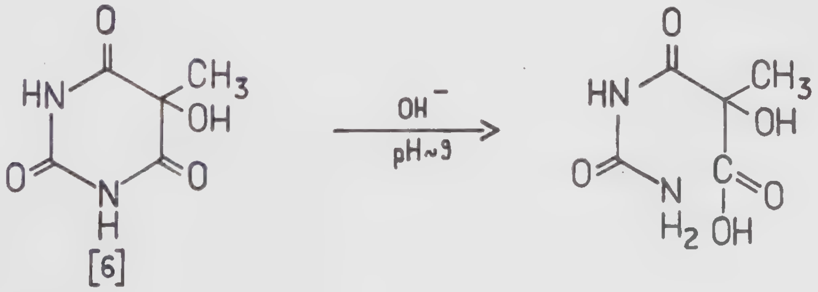


Fig. III-5 : Ouverture de l'acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique.

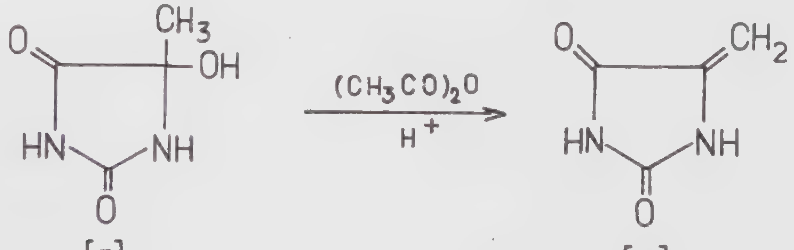
Le mécanisme de cette réaction implique une attaque nucléophile de OH^- sur le carbone 6, qui ouvre le cycle entre N-1 et C-6. La méthyl-tartronylurée se révèle au PDAB /49/ du fait de son groupement $-CO-NH_2$.

Après réaction, chromatographie, révélation au PDAB et autoradiographie, la parfaite coïncidence entre la tache colorée (due à l'introduction d'acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique inerte dans le mélange réactionnel) et la tache autoradiographique (due au produit de radiolyse) est concluante. Les R_f sont indiqués tableau I.

III.2.6 - Hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne [5]

Son identification par des méthodes purement chromatographiques va de pair avec celle de l'acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique (Cf. III.2.5). Les R_f dans les deux systèmes de solvants correspondent à ceux du produit de synthèse /112/ (tableau I).

La microréaction caractéristique utilisée est sa transformation, en milieu acide, en méthylène hydantoïne selon la réaction décrite par MURAHASHI et coll. /112/ :



[5] [12]

Fig. III-6 : Déshydratation de l'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne.

L'anhydride acétique entraîne une déshydratation de la fonction alcool qui conduit à la formation d'une liaison éthylénique. La présence, après réaction, chromatographie et autoradiographie, d'un spot marqué à l'emplacement d'une substance à forte absorption UV, et dont les R_f (tableau I) sont ceux de la méthylène hydantoïne de synthèse, permet de conclure sur la nature du produit de départ.

III.2.7 - *Pyruvamide* [2]

C'est le seul produit qui n'ait pas été observé lors de la radiolyse de la thymine. Par contre sa présence a été caractérisée dans la radiolyse de la thymidine /16,23/.

Son identification chromatographique s'effectue de la manière suivante :

L'adjonction de pyruvamide inerte ou plus exactement de thymidine inerte irradiée au point de dépôt du chromatogramme, permet une révélation colorée du pyruvamide à la DNPH /103/ selon la réaction suivante.

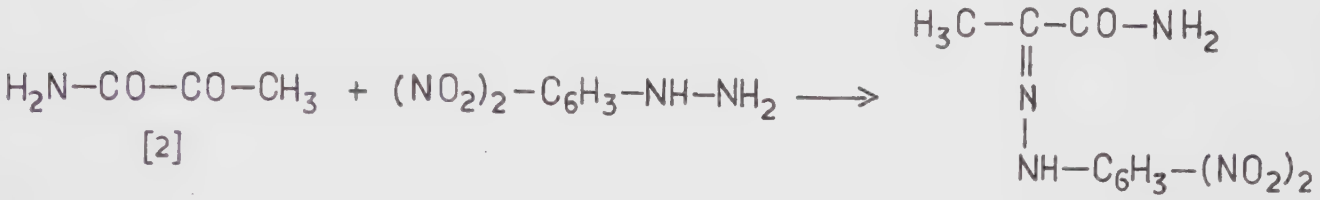


Fig. III-7 : Transformation du pyruvamide en sa dinitro-2,4 phényl-hydrazone.

La présence d'une tache jaune en coïncidence avec une tache marquée et à des R_f qui sont ceux du pyruvamide est significative quant à la nature du produit marqué (tableau I).

Une chromatographie bidimensionnelle sur silice GHR dans les solvants VII et VIII, et telle qu'elle est décrite en II.6.3.1 (dépôt hydrazone inerte + hydrazone issue de l'ADN) nous permet à nouveau d'observer une coïncidence parfaite entre la révélation autoradiographique et la révélation colorée aux R_f indiqués ci-dessous.

Solvant VII $R_f = 0,30$

Solvant VIII $R_f = 0,48$

Les solvants VII et VIII ont été décrits en II.6.3.1.

III.2.8 - *Formyl-N pyruvyl-N' urée* [7]

Les chromatographies sur silice et sur cellulose font apparaître une substance marquée dont les R_f (tableau I) sont ceux de la formyl-N pyruvyl-N' urée synthétisée au laboratoire /162/.

Par chauffage en milieu aqueux, elle se transforme de façon caractéristique en hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne /162/ selon la réaction ci-dessous.

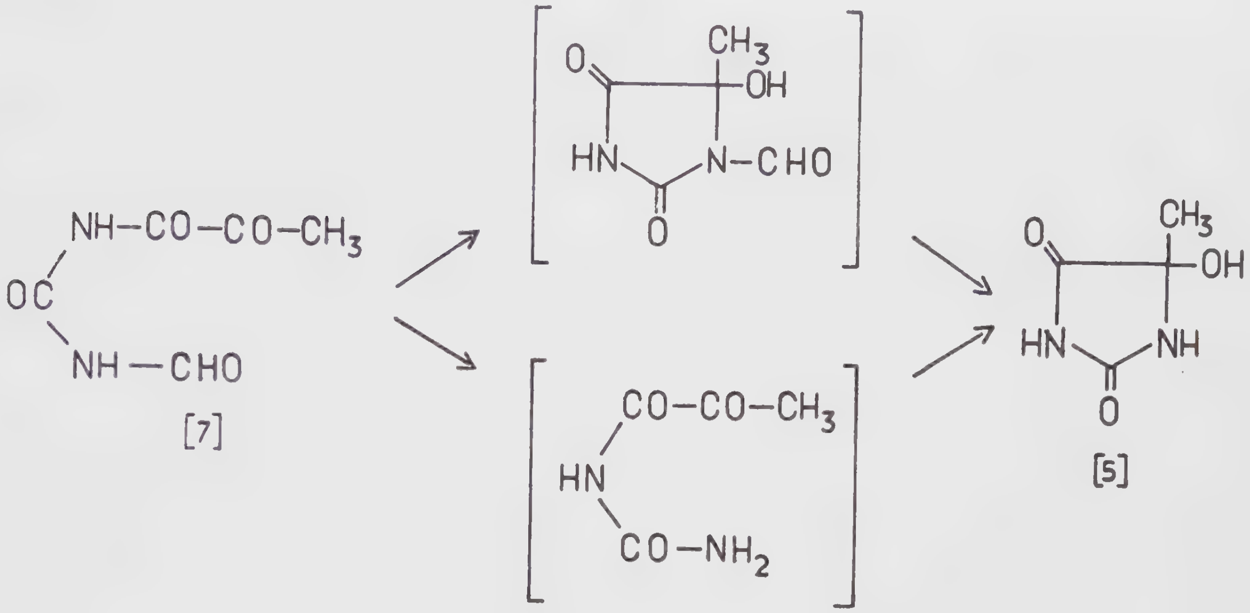


Fig. III-8 : Conversion de la formyl-N pyruvyl-N' urée en hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne.

L'apparition d'un spot autoradiographique, après réaction et chromatographie, à l'emplacement caractéristique de l'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne nous permet de conclure positivement sur la nature du produit de départ.

III.2.9 : *Formylurée* [14]

L'irradiation d'un ADN marqué sur le carbone 2 de la thymine nous a permis de mettre en évidence la libération de formylurée. Ce produit a été identifié chromatographiquement par une parfaite correspondance des R_f avec ceux du produit témoin révelé au PDAB (tableau I).

III.2.10 - *Acetylurée* [11]

Le même ADN marqué sur le C-2 libère un produit [11] dont l'emplacement chromatographique correspond parfaitement aux R_f du produit de référence (tableau I).

III.3 - ETUDE CINETIQUE.

La figure III-9 représente la variation, en fonction de la dose, de l'importance relative de chacun des produits par rapport à la quantité totale de radioproduits.

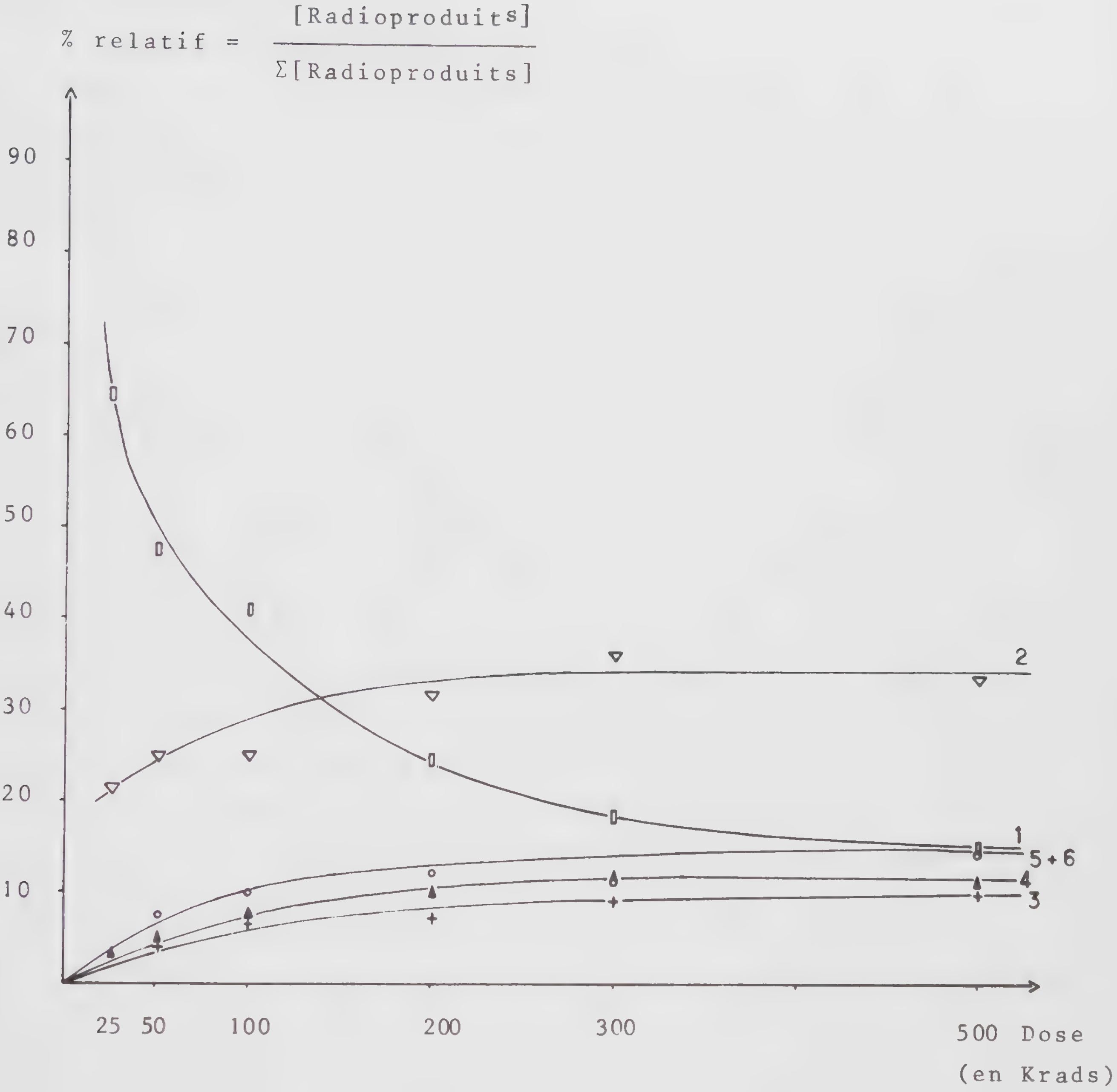
Nous observons, lorsque les doses augmentent, une décroissance de la thymine et une augmentation des autres produits. La thymine est le produit majeur aux faibles doses, alors qu'aux fortes doses apparaissent de façon croissante, en premier lieu, le pyruvamide et, de façon moindre, les glycols, l'acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique et l'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne.

III.4 - DISCUSSION.

Parmi les sept produits de radiolyse identifiés, il n'y a que le pyruvamide qui soit un produit de radiolyse de la thymidine ; tous les autres sont des produits de radiolyse de la thymine.

Il est intéressant de souligner que nous n'avons trouvé aucune trace notable de thymidine ou de produits de saturation de la double liaison 5-6 de la thymidine. Par contre, il semble certain que des nucléotides soient libérés au cours de l'irradiation. En effet, lorsque nous effectuons une chromatographie des produits de radiolyse de l'ADN extraits dans le méthanol et séparés dans les solvants I et II, nous observons au point de dépôt une tache présentant une forte absorption UV et une forte absorption autoradiographique ; lorsque le mélange de radioproduits est déposé après solubilisation dans l'acétone, nous observons au point de dépôt, après élution dans les mêmes solvants, une tache dont les révélations UV et autoradiographique sont très faibles, quand elles ne sont pas nulles.

Ces observations sont révélatrices : le méthanol solubilise les nucléotides et oligonucléotides à courte longueur de chaîne, et la présence de produits radioactifs au point de dépôt est caractéristique de la présence de nucléotides thymidyliques ; il est en effet bien connu que le groupement phosphate, par sa forte polarité, bloque au point de dépôt les substances auxquelles il est rattaché. Par contre, l'acétone ne solubilisant pas les nucléotides, il n'est pas



<u>Fig. III-9</u> : FORMATION DES PRINCIPAUX PRODUITS DE COUPURE DE LA LIAISON GLYCOSYLAMINE DE L'ADN IRRADIE EN CONDITION AEREE EN FONCTION DE LA DOSE APPLIQUEE.

1 = thymine ; 2 = pyruvamide ; 3 = dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis* ; 4 = dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *trans* ; 5 = hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne ; 5 = acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique.

étonnant d'obtenir, après élution, des points de dépôt souvent vierges de toute radioactivité.

La nature des nucléotides et oligonucléotides reste à déterminer, quant à leur longueur et aux altérations qui les affectent. Mais il paraît d'ores et déjà probable que les lésions de la base thymine que nous avons caractérisées seront retrouvées au niveau de l'acide thymidylique et des oligothymidylates.

La libération de nucléotides et l'absence de nucléosides peut s'interpréter assez facilement : la présence des premiers implique une seule rupture, soit en 3', soit en 5', des liaisons phosphodiester le long de la chaîne, alors que la présence des seconds impliquerait une double cassure, d'une liaison phosphodiester en 3' et de la liaison phosphodiester adjacente en 5'. On conçoit qu'une double rupture soit moins probable qu'une simple rupture. En outre, il a été montré que la radiolyse de thymidine 5'-monophosphate /17/ conduit entre autre à la formation de pyruvamide ainsi que de thymine et de ses principaux radioproduits ; mais il n'a été trouvé aucune trace de thymidine intacte ou modifiée. Ces résultats tendent à prouver qu'une radiorupture de la liaison phosphodiester est relativement facile mais que la rupture de la liaison phosphomonoester semble ne jamais se produire /126/ ; ceci peut expliquer en partie l'absence de la thymidine et de ses radioproduits au niveau de la radiolyse de l'ADN.

Cette absence indiscutable est, en outre, un fait capital car il nous amène à constater que nous sommes en désaccord avec les travaux récents de ULLRICH et HAGEN /166/. Ces derniers, en effet, estiment que des nucléosides sont libérés par irradiation γ de l'ADN. L'absence de nucléoside semble toutefois plus probable dans la mesure où elle est en partie corroborée par les résultats observés au niveau de l'acide thymidylique.

Par contre, la libération de thymine a été effectivement observée par les mêmes auteurs /166/ et quelques autres avant eux /70,89,144/.

La présence des glycols *cis* et *trans* de thymine et de l'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne est à rapprocher, dans une certaine mesure, des résultats obtenus *in vivo* par HARIHARAN et CERUTTI /63, 64/ sur l'ADN de la bactérie *Micrococcus radiodurans*. Ces auteurs

pensent que ces composés figurent très certainement parmi les radio-produits éliminés par la bactérie durant l'incubation effectuée après irradiation , et réduits par le borohydrure. La confrontation des deux types de résultats ne peut cependant être, à ce niveau, que très relative : en effet, nous considérons dans ce chapitre les produits d'exclusion directe de l'ADN, alors que CERUTTI dose par le borohydrure les radioproduits éliminés de la chaîne par la bactérie , donc encore insérés sur la chaîne avant l'incubation de post-irradiation (le milieu de culture utilisé pendant l'irradiation, susceptible de contenir les éventuels produits de coupure directe, est éliminé et remplacé par du milieu frais). Un rapprochement plus complet et plus justifié pourra être possible dans le chapitre V où sont étudiés les produits de la chaîne. Toutefois une certaine comparaison des deux types de résultats au niveau de ce chapitre demeure raisonnable, dans la mesure où l'on a pu prouver que les produits de coupure provenaient effectivement de la chaîne, et non d'une radiolyse de la thymine libérée dans un premier temps.

Interprétation de l'étude cinétique.

La diminution de la thymine et l'augmentation concomitante des autres produits peuvent s'interpréter ainsi :

- D'une part, la libération de thymine peut être présentée comme un processus nécessitant l'intervention d'un seul radical OH˙ : un seul impact de ce radical sur la liaison N- glycosidique, selon un mécanisme dont nous discuterons (*vide infra*), libère la thymine. Par opposition, la libération de glycol (par exemple) serait un processus faisant intervenir deux radicaux OH˙ ; deux impacts sont nécessaires.

soit libération de thymine puis fixation de OH˙

soit fixation de OH˙ puis libération de thymine

- D'autre part, l'influence de la structure secondaire sur la radiosensibilité de l'ADN, déjà notée par certains auteurs [4,46,152,165], n'est probablement pas négligeable dans le cas présent. Ainsi , aux faibles doses, la thymine est protégée grâce à l'enroulement en double hélice des deux brins d'ADN (les bases sont rejetées à l'intérieur de cet enroulement) ; plus précisément, la double liaison 5-6 est protégée et par conséquent c'est la liaison N-glycosidique qui est attaquée. Quand la dose augmente, il se produit

une rupture progressive des liaisons hydrogène /32,134/ assurant la cohésion de l'ensemble, et la double hélice ne subsiste plus ; la double liaison 5-6 n'est plus protégée et se trouve plus attaquable : les autres produits apparaissent graduellement.

Mécanismes de libération de la thymine.

Ils seront examinés en détail, ainsi que leurs implications, à l'issue de la *1ère partie* regroupant les produits de coupure obtenus en conditions aérées et désaérées. En effet, la libération de thymine est un phénomène commun aux deux types de conditions, et suffisamment important pour être traité dans un chapitre spécial.

Mécanisme de libération du pyruvamide.

Ce produit est le seul parmi ceux que nous avons identifiés qui ne se forme pas par radiolyse de la thymine. Par contre, il apparaît comme le produit majeur de la radiolyse de thymidine /16,23/ et d'acide thymidylique /17/. Ceci prouve de façon irréfutable que le produit correspondant que nous avons isolé au niveau de l'ADN est préformé sur la chaîne, autrement dit, sa présence résulte effectivement de l'action directe des radicaux OH˙ sur la chaîne et non pas d'interactions entre radicaux OH˙ et molécule de thymine éventuellement libérée dans un premier temps.

Le mécanisme de formation du pyruvamide n'est pas encore parfaitement élucidé. Les étapes qui ont pu être établies lors des études au niveau du nucléoside ou du nucléotide semblent extrapolables à l'ADN (fig. III-10) :

L'action d'un radical OH˙ sur la double liaison 5-6, suivie d'une oxydation par l'oxygène, conduit à la formation d'hydroperoxyde du type 5 ou 6. Cette présence de peroxydes dans l'ADN est connue : très tôt, ils ont été détectés /38,135,137,177/ et isolés par précipitation à l'acide trichloracétique. La dégradation hydrolytique de ces hydroperoxydes conduit à un dérivé intermediaire instable du type formyl-N pyruvyl-N' urée désoxyriboside dont la partie osidique est toujours insérée dans la chaîne polynucléotidique. Diverses coupures hydrolytiques de cet intermédiaire, dont les mécanismes ne sont pas très connus, conduisent à la libération de pyruvamide et de gaz carbonique ; le fragment restant sur la chaîne est le formamide.

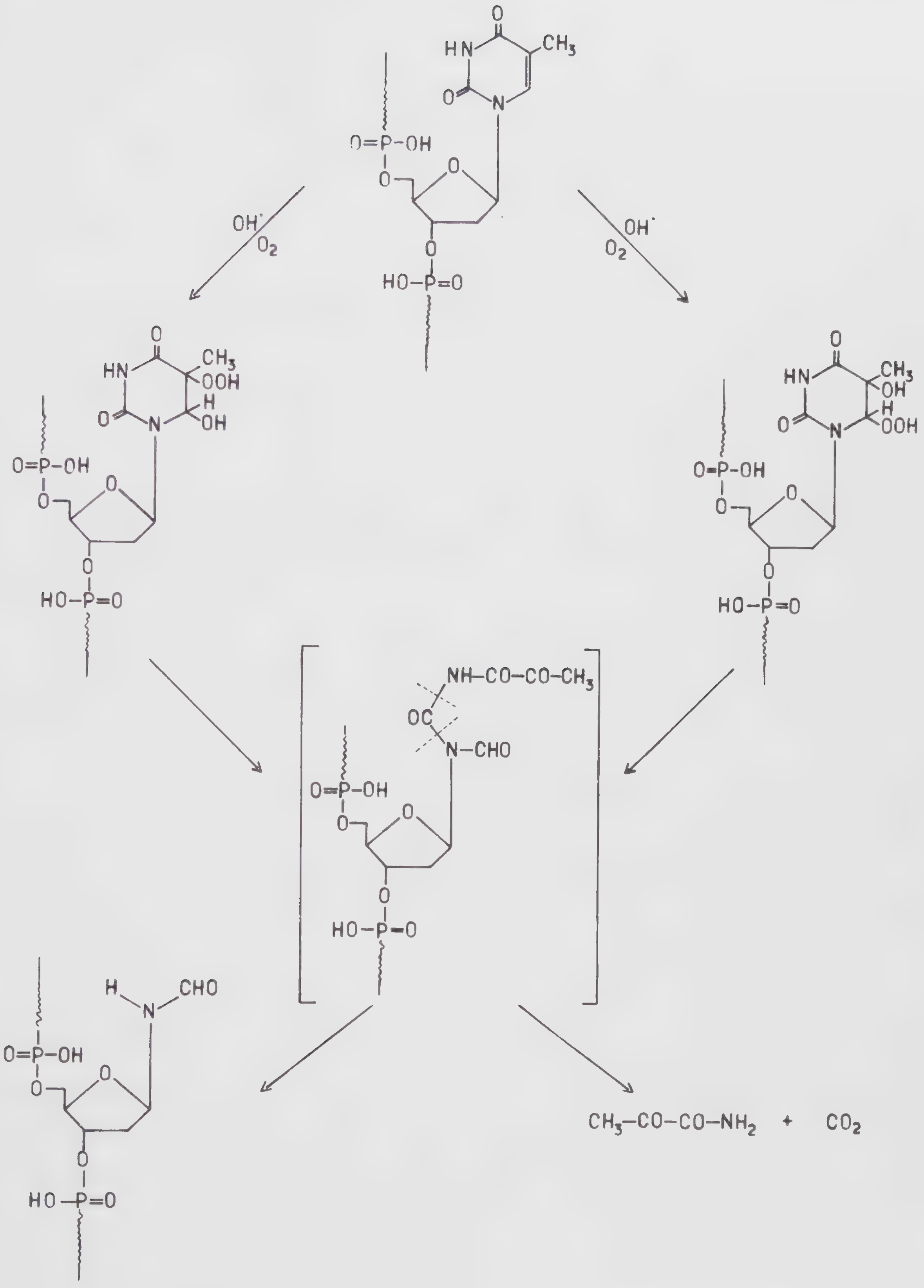


Fig. III-10 : MECANISME DE LIBERATION DU PYRUVAMIDE.

Ce mécanisme est en outre intéressant, car, en mettant en relief l'intervention d'un seul radical OH˙ (suivie de ruptures hydrolytiques) pour libérer le pyruvamide, il permet de rendre compte du fait que la courbe de variation de ce produit en fonction de la dose (fig. III-9) ne tende pas vers zéro quand cette dernière tend vers zéro, contrairement à ce que nous avons pu observer pour les autres radioproduits.

Mode de formation des autres produits.

La présence des autres produits de radiolyse (glycols, acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique, hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne, formyl-N pyruvyl-N' urée) peut être envisagée selon deux voies :

- Ils peuvent être préformés sur la chaîne par action d'un radical OH˙ sur le fragment thymidyl de l'ADN, puis libérés de cette chaîne par action d'un second radical OH˙ entraînant la rupture de la liaison N-glycosidique.

- Mais ils peuvent être également issus de l'action des radicaux OH˙ sur la thymine intacte éliminée préliminairement de la chaîne par l'action d'un premier radical OH˙.

Le mécanisme de formation de ces composés a été étudié en détail au niveau de la thymine /20,22,154,159/ et de la thymidine /16,20,23/. Il peut être schématisé (fig. III-11), sans préjuger pour autant de l'ordre séquentiel dans lequel s'effectuent la rupture de la liaison N-glycosidique et l'attaque de la double liaison 5-6.

En fait, comme nous le verrons plus loin, la plupart de ces produits ont pu être retrouvés par hydrolyse douce de la chaîne d'ADN irradié : c'est là la preuve irréfutable qu'ils étaient bien préformés, tout au moins en partie, sur la chaîne polynucléotidique (il est bien évident, en effet, qu'une fraction non connue des radioproduits provient en fait d'une radiolyse pure et simple de la thymine libérée ; ceci a pu être mis en évidence au niveau de la thymidine /16/).

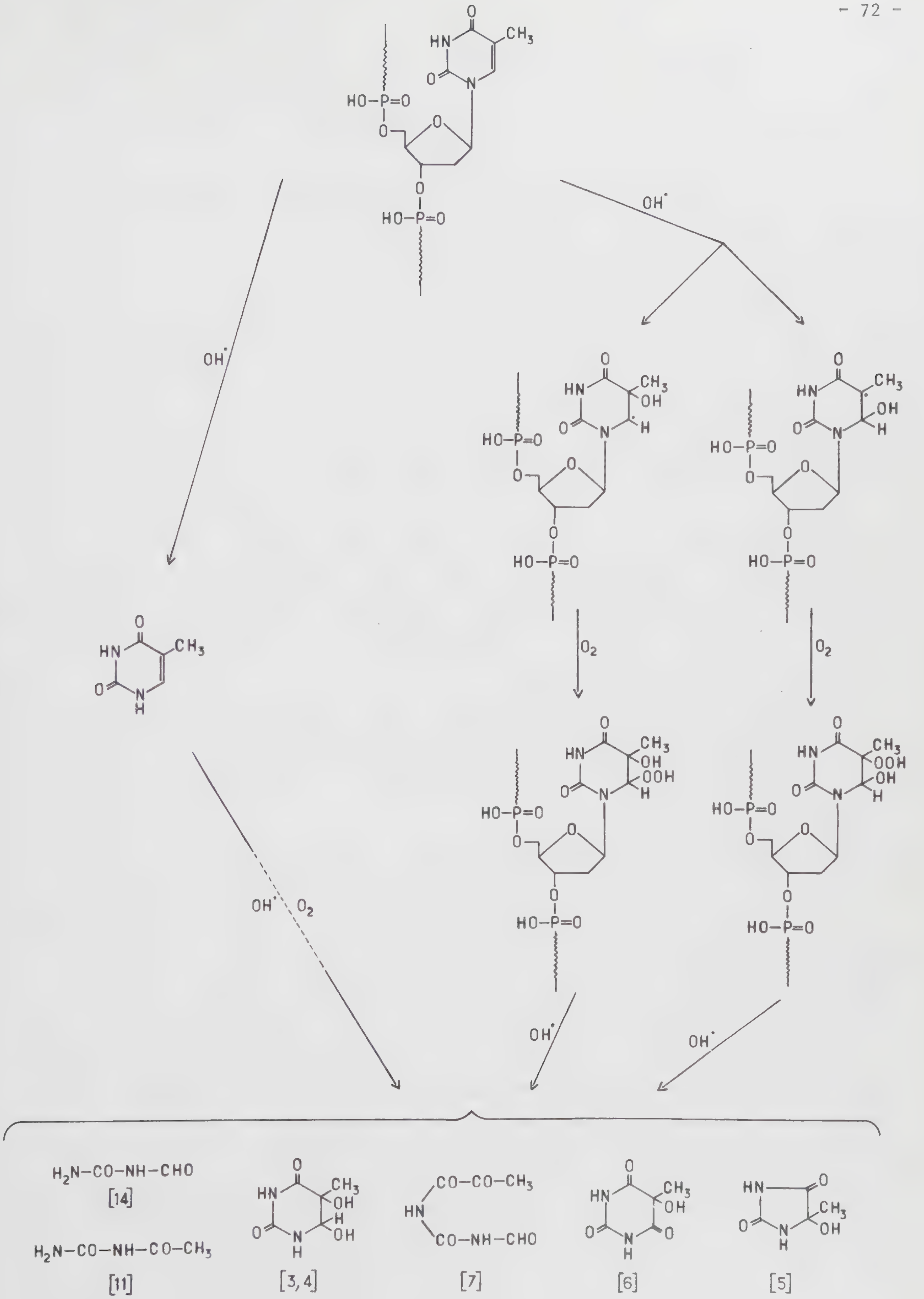


Fig. III-11 : MODE DE FORMATION DES PRINCIPAUX PRODUITS DE COUPURE DE LA LIAISON N-GLYCOSIDIQUE DE L'ADN IRRADIE EN CONDITION AEREE.

CHAPITRE IV

RADIOLYSE DE L'ADN EN SOLUTION AQUEUSE DESAEREE

IV.1 - INTRODUCTION

Le comportement du noyau de la cellule demeure assez controversé à l'heure actuelle : il n'a pu être démontré sans ambiguité si la vie nucléaire devait être considérée comme s'effectuant en aérobiose ou en anaérobiose.

Compte tenu de cette remarque, il nous a paru intéressant d'étudier le comportement de l'ADN sous rayonnement en conditions désaérées, après avoir identifié les principales lésions produites sur le fragment thymine en milieu aéré.

La radiolyse de l'ADN en solution aqueuse désaérée donne naissance à neuf produits de coupure de la liaison glycosylamine que nous avons séparés et identifiés /157/ (fig. IV-1 et III-2). Ce sont :

- thymine [1]
- dihydro-5,6 thymine [8]
- hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine [9]
- hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine *cis* et *trans* [10a,10b]
- dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis* et *trans* [3,4]
- acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique [6]
- hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne [5]

Comme nous l'avons vu, les résultats relatifs aux modifications du fragment thymidylique de l'ADN sous rayonnement sont rares. A notre connaissance, aucun résultat relatif à de telles modifications produites en milieu désaéré n'a été publié à ce jour, exception faite à la rigueur pour les travaux de CERUTTI /64/.

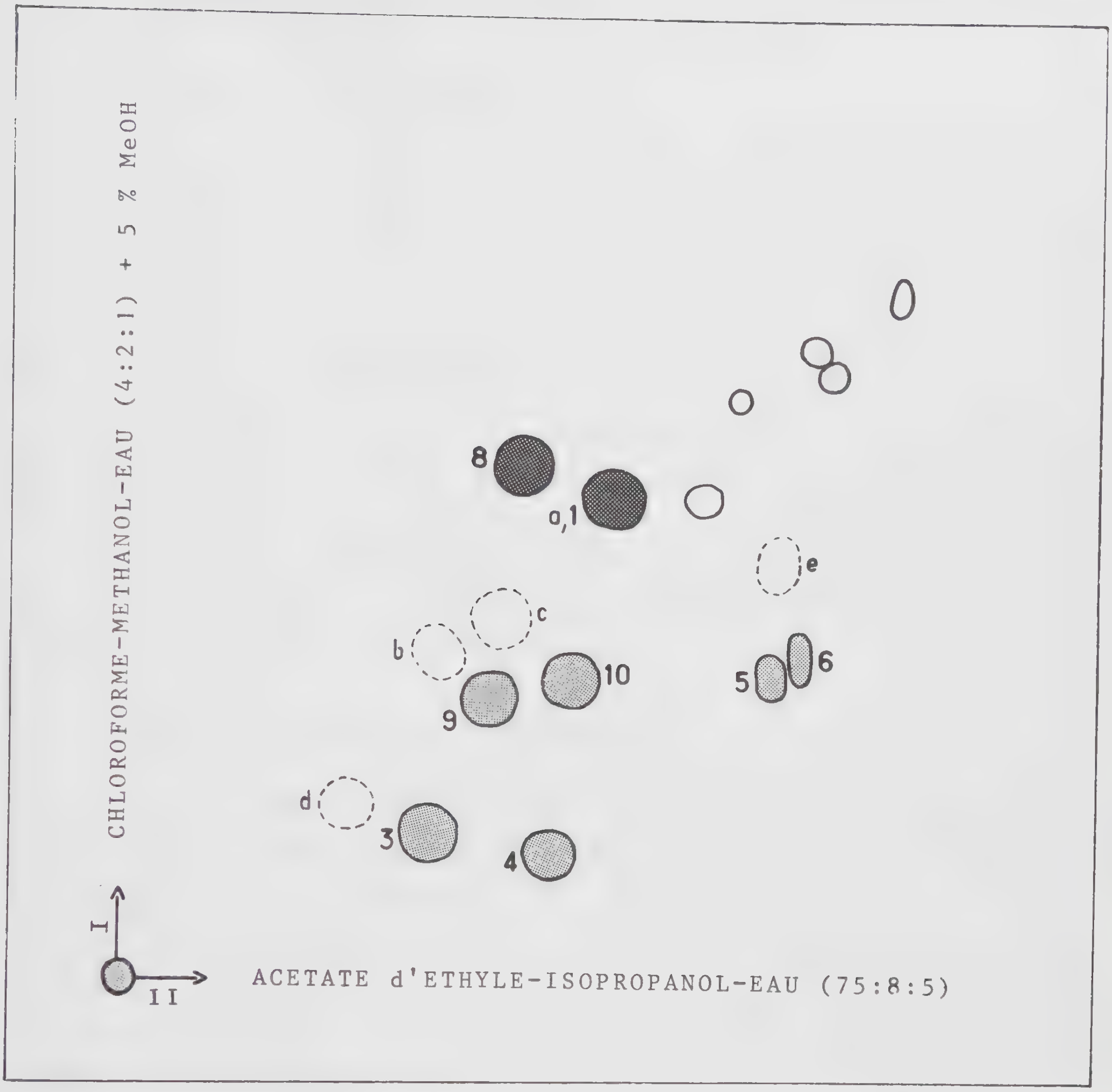


Fig. IV-1 : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE SILICE MN-N-HR DES PRODUITS DE COUPURE DE LA LIAISON GLYCOSYLAMINE DE L'ADN IRRADIE EN SOLUTION AQUEUSE DESAEREE.

1 = thymine ; 3 = dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis* ; 4 = dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *trans* ; 5 = hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne ; 6 = acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique ; 8 = dihydro-5,6 thymine ; 9 = hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine ; 10 = hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine.

a = thymine ; b = thymidine ; c = uracile ; d = uridine ; e = fluoro-5 uracile.

IV.2 - IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES PRODUITS RADIOFORMES

IV.2.1 - *Généralités.*

Les difficultés rencontrées dans la détermination de ces produits ont été les mêmes que celles évoquées en III.2.1. Le seul moyen de les caractériser a été, ici aussi, le recours aux micro-réactions spécifiques.

IV.2.2 - *Thymine* [1]

De la même façon qu'en milieu aéré, c'est le premier produit qui apparaît lors de l'administration de faibles doses, en même temps que le produit majeur tout au long de l'irradiation.

Elle est aisément identifiée par sa forte absorption UV à une position dont les R_f, dans les deux systèmes de solvants, sont donnés (tableau I).

IV.2.3 - *Dihydro-5,6 thymine* [8]

Sa position chromatographique sur silice et sur cellulose, dans les deux cas accolée à la thymine, est caractéristique et est donnée par les R_f (tableau I).

L'action d'un milieu alcalin sur la dihydro-5,6 thymine entraîne l'ouverture du cycle pyrimidique entre N-3 et C-4, de la même façon que sur l'acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique, selon la réaction suivante.

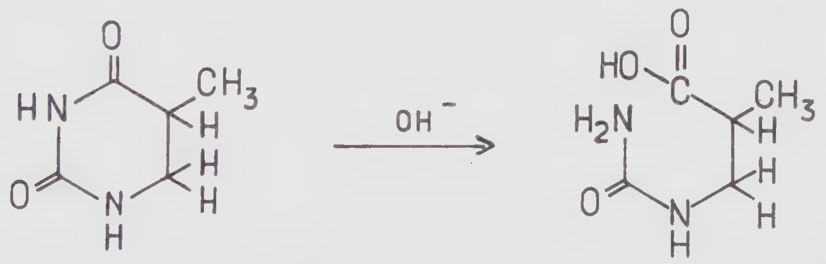


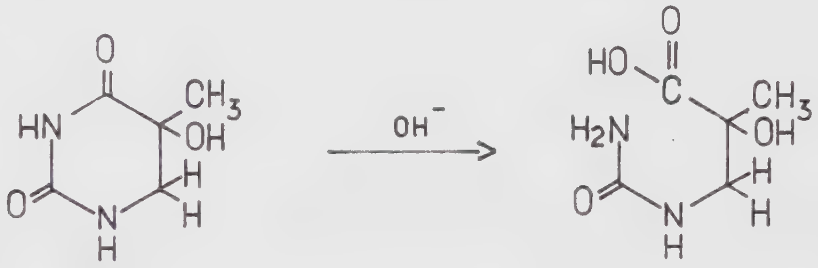
Fig. IV-2 : Ouverture du cycle de la dihydro-5,6 thymine.

La méthyl-2 propionylurée obtenue présente un groupement $-CO-NH_2$ entraînant une possibilité de détection colorée au PDAB /49/. Après réaction, chromatographie, révélation au PDAB et autoradiographie, la parfaite coïncidence entre la tache colorée (due à l'introduction de dihydro-5,6 thymine inerte dans le mélange réactionnel) et la tache marquée (due au produit de radiolyse) est significative. Les R_f sont indiqués tableau I.

IV.2.4 - Hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine [9]

Les analyses chromatographiques sur silice et sur cellulose font apparaître une substance [9] dont les R_f (tableau I) sont ceux du produit de synthèse /115/.

En milieu alcalin, ce produit est transformé en hydroxy-2 méthyl-2 propionylurée par attaque nucléophile de OH^- sur le C-4 et ouverture du cycle pyrimidique selon la réaction ci-dessous :



[9]

Fig. IV-3 : Ouverture de l'hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine.

Après réaction (effectuée sur un mélange de produit de radiolyse et de substance témoin) et chromatographie, la présence d'un spot autoradiographique à l'emplacement de l'hydroxy-2 méthyl-2 propionylurée localisée par test coloré /49/, permet de conclure sur la nature du produit de départ.

IV.2.5 - Hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine |10a,10b|

Les isomères *cis* et *trans* de ce composé ne sont pas séparés directement sur silice ou sur cellulose dans les systèmes de solvant

correspondants (tableau I), alors qu'ils le sont sur cellulose DC Aluminium dans les systèmes de solvants I + II.

	Forme *cis*	Forme *trans*
R_fI	0,26	0,33
R_fII	0,46	0,52

L'action de l'eau oxygénée sur l'hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine de forme *cis* ou *trans* conduit à la formation de l'hydro-peroxy-6 dihydro-5,6 thymine de forme *cis* et *trans* /21,154/. Le mécanisme de la réaction (type SN1) implique l'obtention des formes *cis* et *trans* des peroxydes à partir de l'un ou l'autre isomère de l'hydrate.

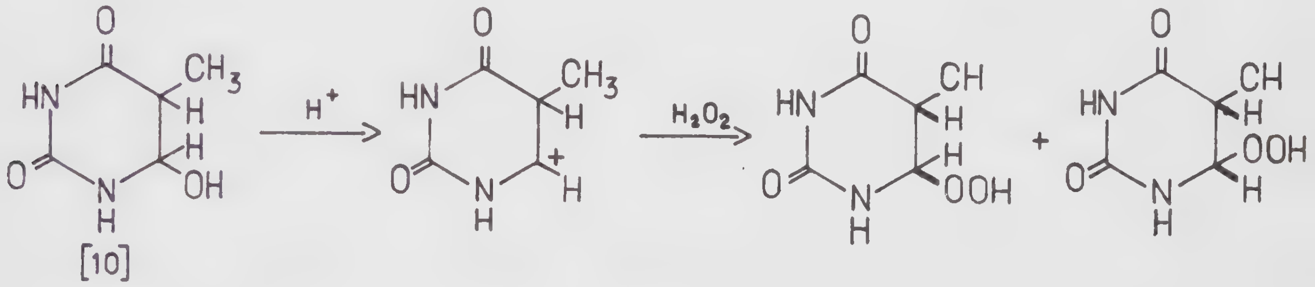


Fig. IV-4 : Peroxydation de l'hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine.

L'iodure de potassium réduit les deux formes de ce peroxyde /21,154/ en hydrate de même forme. Cette réaction est mise à profit dans la révélation colorée des peroxydes que nous avons utilisée /149/. Les deux spots autoradiographiques sont en parfaite coïncidence avec deux taches colorées (dues à l'introduction d'hydrate de synthèse /21, 116/ au départ) aux R_f indiqués ci-dessous :

	Peroxyde *cis*	Peroxyde *trans*
Solvant I	0,26	0,40
Solvant II	0,46	0,58

IV.2.6 - Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine cis et trans [3,4]

Les glycols de thymine sont nettement moins importants en milieu désaéré qu'en milieu aéré.

Ils sont déterminés de la même façon qu'en milieu aéré, en l'occurence :

- l'action du métaperiodate de sodium /162/ transforme le glycol *cis* en formyl-N pyruvyl-N' urée (fig. III-3). En outre, le produit de transformation du glycol conduit par chauffage à l'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne qui a pu être caractérisée chromatographiquement. Cette réaction, caractéristique de la formyl-N pyruvyl-N' urée (fig. III-8),constitue une preuve supplémentaire quant à la nature du produit [3].

- Le glycol *trans* est isomérisé en glycol *cis* /92/ (fig. III-4), rendant éventuellement possible dans un second temps l'action du métaperiodate de sodium.

IV.2.7 - Acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique [6]

De la même manière qu'en milieu aéré, la transformation de ce produit, en milieu alcalin, en méthyl tartronylurée /41/ (fig. III-5) permet son identification par superposition des révélations colorée et autoradiographique.

IV.2.8 - Hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne [5]

Le dérivé de déshydratation du produit [5] /112/ donne un spot autoradiographique en parfaite coïncidence avec la révélation UV intense de la méthylène-hydantoïne issue de l'adjonction d'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne inerte dans le mélange réactionnel (fig. III-6).

IV.3 - ETUDE CINETIQUE.

La variation, en fonction de la dose, de l'importance relative de chacun des produits par rapport au total des radioproduits est représentée figure IV.5.

On note une diminution progressive de la thymine au profit d'une augmentation des autres produits de radiolyse. Cependant, contrairement à ce qui avait pu être constaté en milieu aéré, la thymine reste le produit prépondérant jusqu'à des doses de l'ordre de 500 Krads, et probablement au-delà, dans la mesure où l'on devine la formation d'un plateau à partir de cette valeur pour les autres produits.

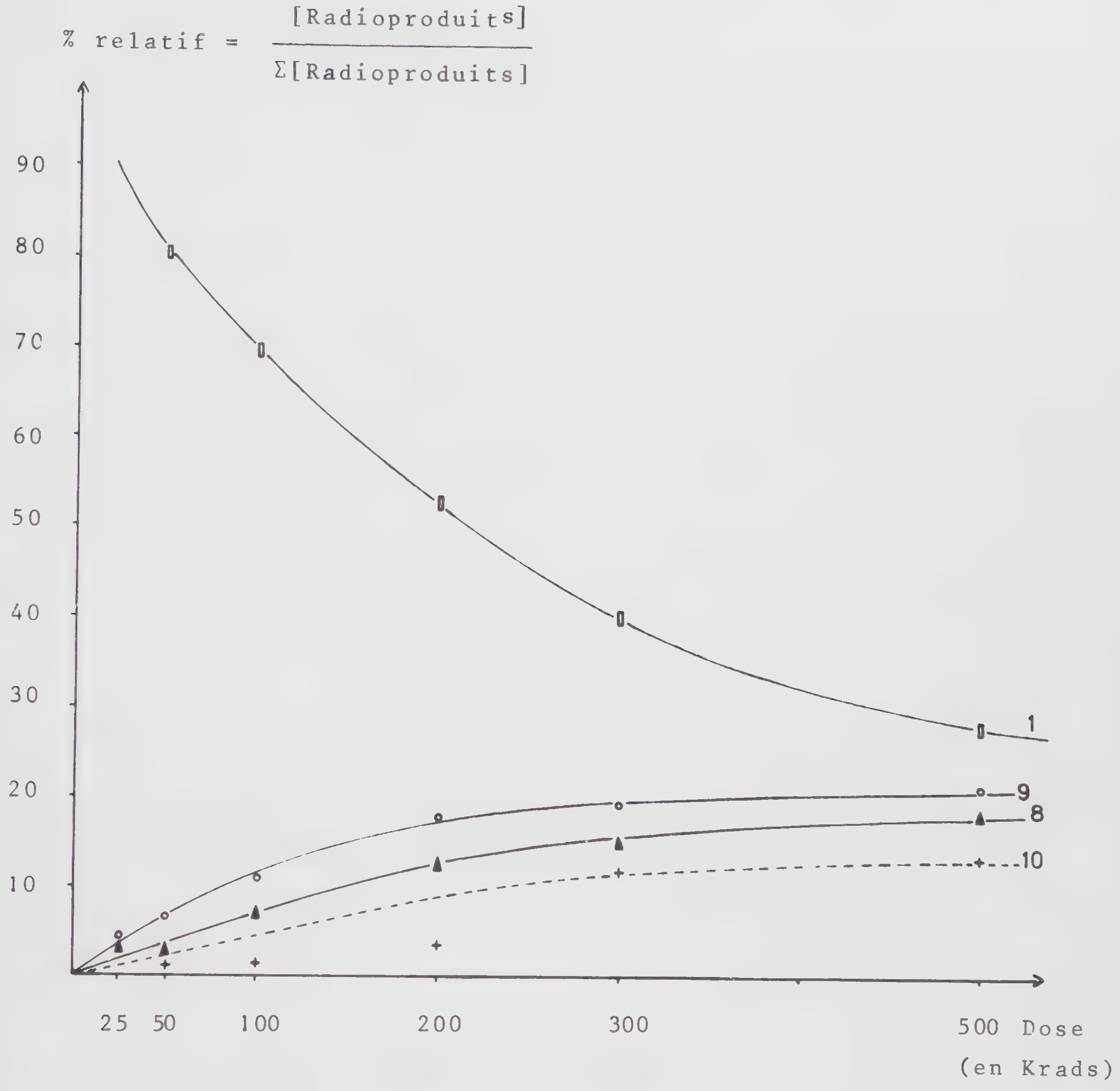


Fig. IV-5 : LIBERATION DES PRINCIPAUX PRODUITS DE COUPURE DE LA LIAISON GLYCOSYLAMINE DE L'ADN IRRADIE EN CONDITION DESAEREE EN FONCTION DE LA DOSE APPLIQUEE.

1 = thymine ; 8 = dihydro-5,6 thymine ; 9 = hydroxy-5 dihydro-5, thymine ; 10 = hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine.

Nous constatons dans le cas de l'hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine une dispersion des points rendant difficile, sinon impossible, le tracé de la courbe représentative de la variation de ce produit. Ceci est probablement lié à la relative instabilité de cet "hydrate" qui redonne facilement la thymine par perte d'une molécule d'eau.

IV.4 - DISCUSSION.

Tous les radioproduits caractérisés sont des composés observés au niveau de la radiolyse de la thymine /154,159/. Aucun d'entre eux n'est un radioproduit spécifique de la thymidine, comme c'était le cas en milieu aéré pour le pyruvamide.

De la même façon qu'en conditions aérées, la présence de nucléotides a pu être détectée dans le milieu d'irradiation, mais aucune trace de nucléosides n'a pu y être décelée. Les remarques émises à ce propos en III.4 demeurent valables.

La présence d'hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine, des dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine, et éventuellement d'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne est à rapprocher, avec les mêmes réserves que celles émises en III.4, des résultats de HARIHARAN et CERUTTI /64/. En effet, ces derniers présentent ces radioproduits comme ceux réductibles au borohydrure dans la mesure où la bactérie, irradiée en présence d'azote, les élimine de son ADN dans le milieu d'incubation renouvelé après irradiation.

Interprétation de l'étude cinétique.

La diminution de l'importance relative de la thymine et l'augmentation simultanée des autres produits peuvent être interprétées par des hypothèses très proches de celles émises pour rendre compte du même phénomène en milieu aéré, en l'occurence :

- Le rôle protecteur de l'enroulement en double hélice sur la double liaison 5-6, aux faibles doses, demeure valable /4,46,165/.

- L'intervention d'un seul radical OH˙ pour libérer la thymine, et de deux radicaux pour faire apparaître les autres radio-

produits dans le milieu est une hypothèse toujours justifiée à la différence près que l'attaque de la double liaison 5-6 fait intervenir un radical pouvant être OH$^\bullet$, H$^\bullet$ ou e^-_{aq} *(vide infra)*, alors qu'en milieu aéré seul le radical OH$^\bullet$ était impliqué dans cette attaque ; le second radical, qui entraîne la rupture de la liaison N-glycosidique, semble ne pouvoir être qu'OH$^\bullet$ dans les deux cas /16/.

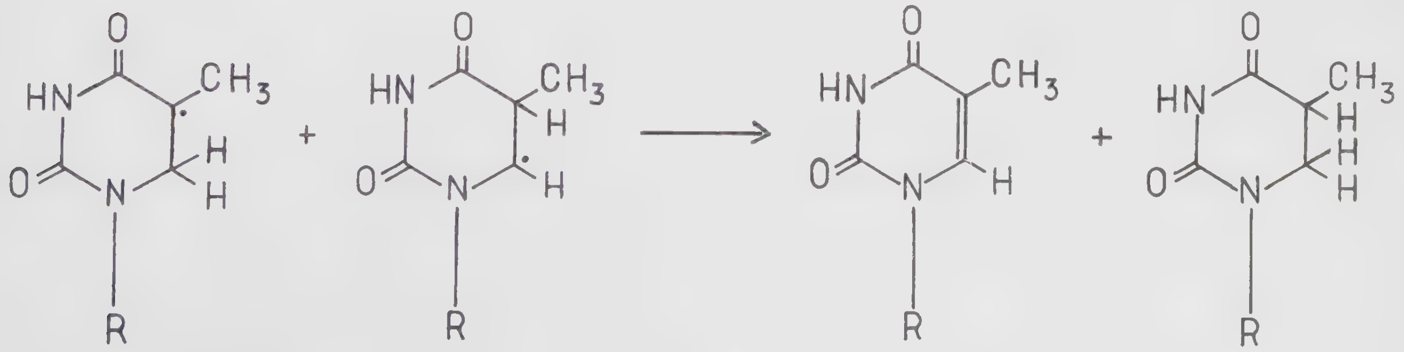
Mécanismes de libération de la thymine

Ils seront examinés en détail à l'issue de ce chapitre.

Mode de formation des divers autres radioproduits

Il ne peut être question de proposer un schéma de formation de ces radioproduits dans la mesure où les mécanismes de leur formation au niveau de la base ou du nucléoside isolés ne sont pas encore vraiment élucidés.

L'attaque des radicaux H$^\bullet$ ou e^-_{aq} sur la double liaison 5-6 conduit certainement à la formation des radicaux dihydrothymyle-5 et dihydrothymyle-6 ; l'attaque des radicaux OH$^\bullet$ donne toujours les hydroxy-5 dihydro-5,6 thymyle-6 et hydroxy-6 dihydro-5,6 thymyle-5. C'est le devenir de ces radicaux qui demeure controversé. La stabilisation momentanée sous forme de peroxydes est exclue, puisque ces espèces se trouvent dans un milieu exempt d'oxygène. La probabilité d'attaque d'un second radical sur l'un des radicaux thymyle est voisine de zéro, compte tenu des durées de vie des différentes espèces en présence. Il semblerait donc que ce soit des réactions de recombinaison radicalaire, du type de celle représentée ci-dessous, qui sont à l'origine de la formation des principaux radioproduits /81/ :



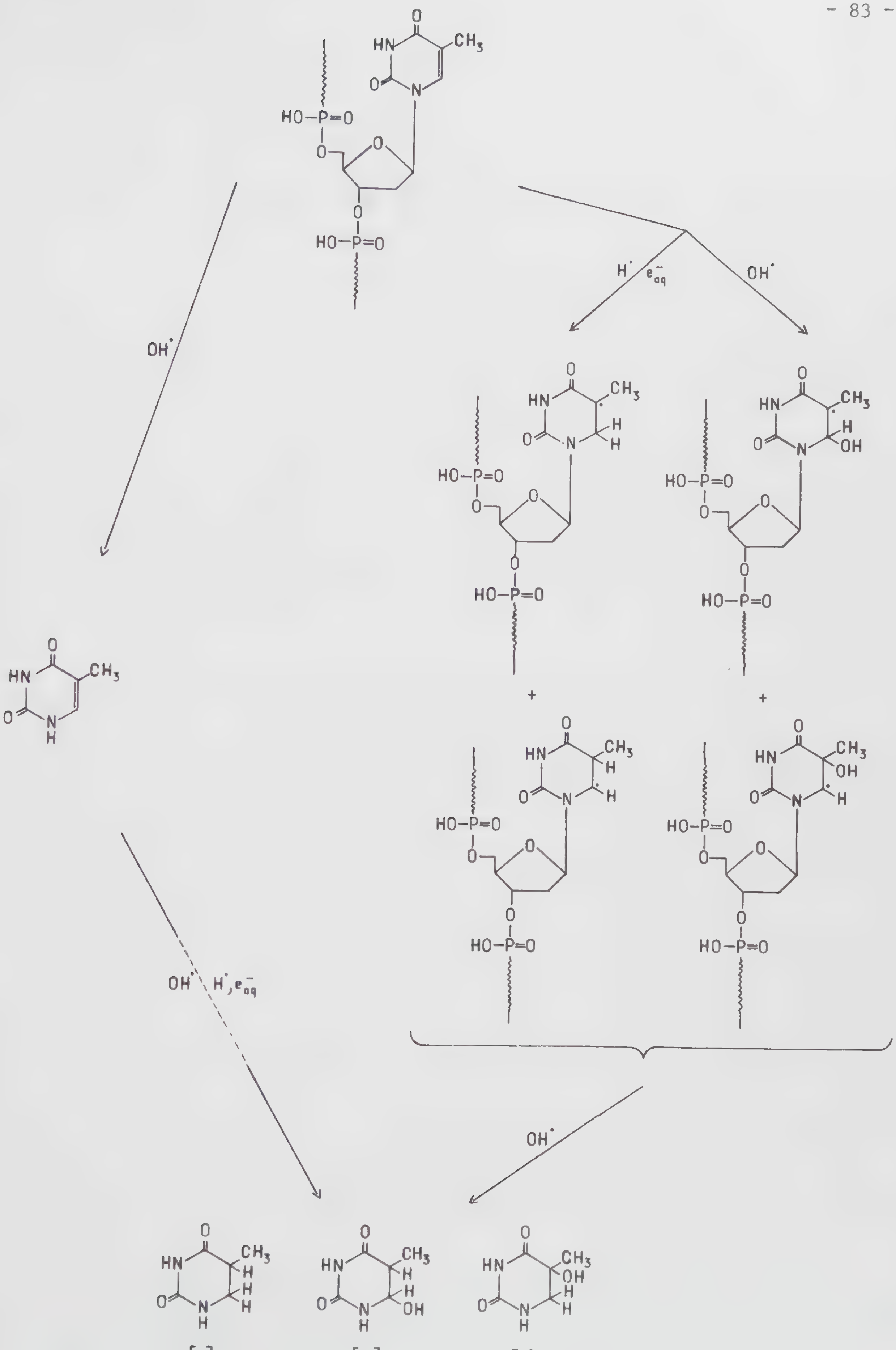
Ces considérations permettent de rendre compte, en outre, du fait que la radiolyse en conditions désaérées conduise essentiellement à des dérivés hydrogénés ou monohydroxylés.

L'apparition des divers radioproduits à l'état libre dans le milieu peut être envisagée selon deux voies, comme en conditions aérées (fig. IV-6) :

- La saturation de la double liaison s'effectue avant l'élimination de la chaîne polynucléotidique du dérivé ainsi obtenu.
- La thymine est d'abord libérée de la chaîne et subit à l'état libre la radiolyse en conditions désaérées.

Notons que la libération de la thymine et de ses dérivés de saturation par rupture de la liaison N-glycosidique semble être le fait des radicaux $OH^{\cdot}$ uniquement /16,133/, les radicaux $H^{\cdot}$ et e^{-}_{aq} ne semblant pas être impliqués dans cette rupture.

Les études d'hydrolyse douce de la chaîne d'ADN nous permettront de conclure que la préformation des radioproduits sur la chaîne est effective, la seconde voie, d'un intérêt secondaire, n'étant bien entendu pas exclue.



[8] [10] [9]

Fig. IV-6 : MECANISME DE FORMATION DES PRINCIPAUX PRODUITS DE COUPURE DE LA LIAISON N-GLYCOSIDIQUE DE L'ADN IRRADIE EN CONDITION DESAEREE.

CHAPITRE V

MECANISMES DE LIBERATION DE LA THYMINE

Plusieurs mécanismes peuvent être invoqués pour expliquer la libération du fragment thymine, qui est un phénomène important tant en conditions aérées que désaérées.

Dans tous les cas, la rupture de la liaison N-glycosidique est fondée sur une modification, voire une dégradation du sucre dont la nature est encore très controversée. En effet, les sites d'attaque des radicaux OH˙ sur le cycle osidique ne sont pas encore parfaitement connus. Des études de RPE essaient de déterminer les radicaux correspondants.

Un premier mécanisme peut être envisagé (fig. V-1) :

L'attaque des radicaux OH˙ sur le carbone 1' induit un arrachement de l'hydrogène anomère et la production d'un radical osidique (A). L'addition de OH˙ ou O_2 sur ce dernier conduit à un dérivé instable (B) qui se scinde en thymine et γ désoxy-2' ribonolactone (C) insérée dans la chaîne polynucléotidique.

Ce mécanisme s'appuie sur des travaux récents :

Ainsi HUTTERMAN et MULLER /76/ ont envisagé la formation d'un radical en 1' sur le sucre par des études de RPE du désoxyribose irradié. CADET et TEOULE ont pu caractériser la γ désoxy-2' ribonolactone libérée parallèlement à la thymine par irradiation de thymidine /16,23/ et d'acide thymidylique /17/. RHAESE et FREESE /126/ ont pu mettre en évidence la libération de base et de lactone par action de H_2O_2 (producteur de radicaux OH˙) sur les acides oligo-désoxyadényliques, et suggèrent un mécanisme similaire pour justifier le phénomène.

Ce mécanisme permet de rendre compte, dans une certaine mesure, d'une libération de thymine observée en conditions désaérées comme étant moindre qu'en milieu aéré. En effet, la possibilité de peroxydation du radical osidique (A) devenant impossible en l'absence d'oxygène, ceci peut expliquer en partie la plus faible rupture de la liaison N-glycosidique constatée dans ces conditions.

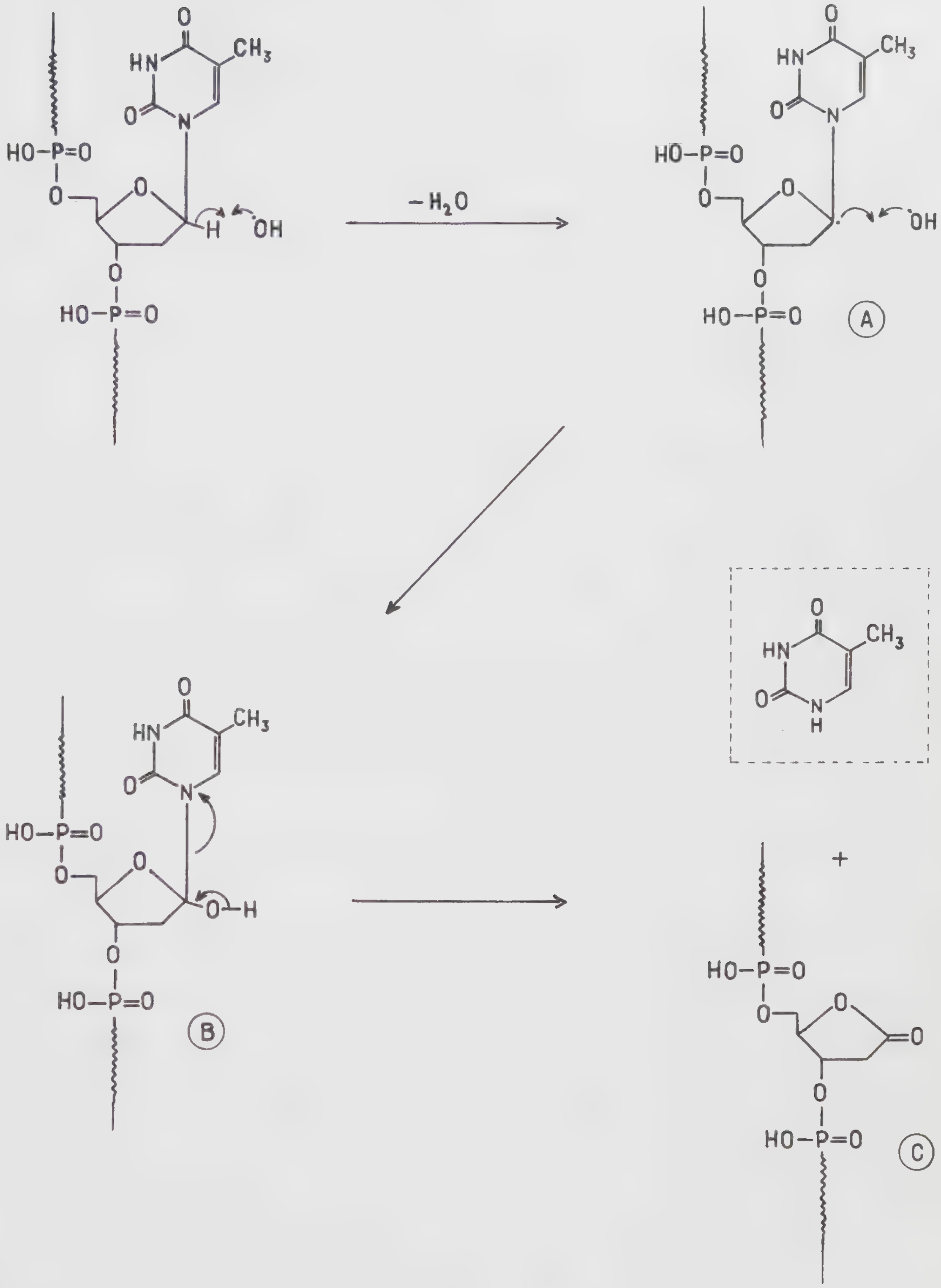


Fig. V-1 : MECANISME 1] DE LIBERATION DE LA THYMINE.

Un intérêt non négligeable de ce mécanisme est de suggérer plusieurs modes de formation des coupures de chaînes éventuelles, ultérieures à la libération de la base. En effet, pour des pH > 7, la lactone (C) tend à s'hydrolyser en acide désoxy-2' ribonique D , disubstitué en 3' et 5' compte ténu de son insertion dans la chaîne. Cet acide, mis en évidence dans des expériences sur la désoxyadénosine /126/, pourrait subir 3 types de réaction interne /7/ (fig. V-2) :

- Une cyclisation 3'-4' d'un groupement phosphate diester avec un groupement hydroxyl en β induirait une rupture de la liaison 5'-phosphate du nucléotide adjacent : une cassure de chaîne est produite comportant un groupement hydroxyl en 5'.

- Une cyclisation 4'-5' d'un groupement phosphodiester, toujours avec un groupement hydroxyl en β, induirait alors une rupture de la liaison 3'-phosphate du nucléotide voisin, créant ainsi une cassure de chaîne comportant un groupement hydroxyl en 3'.

- Une réaction de β-élimination est enfin possible et entraînerait un clivage de la liaison 3'-phosphate du nucléotide contigu : la cassure de chaîne correspondante présenterait un groupement phosphate en 5' et un résidu osidique modifié sur l'autre extrémité.

Un second type de mécanisme paraît concevable au niveau de l'ADN :

Dans des études récentes sur la radiolyse γ du phosphate-5 ribose, STELTER, SONNTAG et SCHULTE-FROHLINDE /150/ élucident le mécanisme permettant de justifier la libération d'acide phosphorique et du résidu osidique caractérisé. Ce mécanisme peut être transposé au niveau de l'ADN et rendre compte de la libération de la base, ainsi que d'éventuelles cassures de chaînes consécutives (fig. V-3).

L'hydrogène en 4' est arraché par un radical OH˙ donnant ainsi naissance à un radical osidique de type 4' (E). L'ouverture hydrolytique de ce cycle osidique radicalaire conduit, par l'intermédiaire d'un dérivé instable (F) (du type du dérivé (B) observé dans le précédent mécanisme) à la libération de thymine et à la formation du nouveau radical osidique (G) disubstitué en 3' et 5'. Ce dernier subit une réaction d'élimination du groupement phosphate en 5' provoquant ainsi une cassure de chaîne dont l'extrémité 3' porte un groupement phosphate. Le nouveau radical (H) de type 5', monosubstitué en 3', se stabilise en présence de ˙RH en donnant naissance au composé osidique (I) , caractérisé sans ambiguité dans les études au niveau

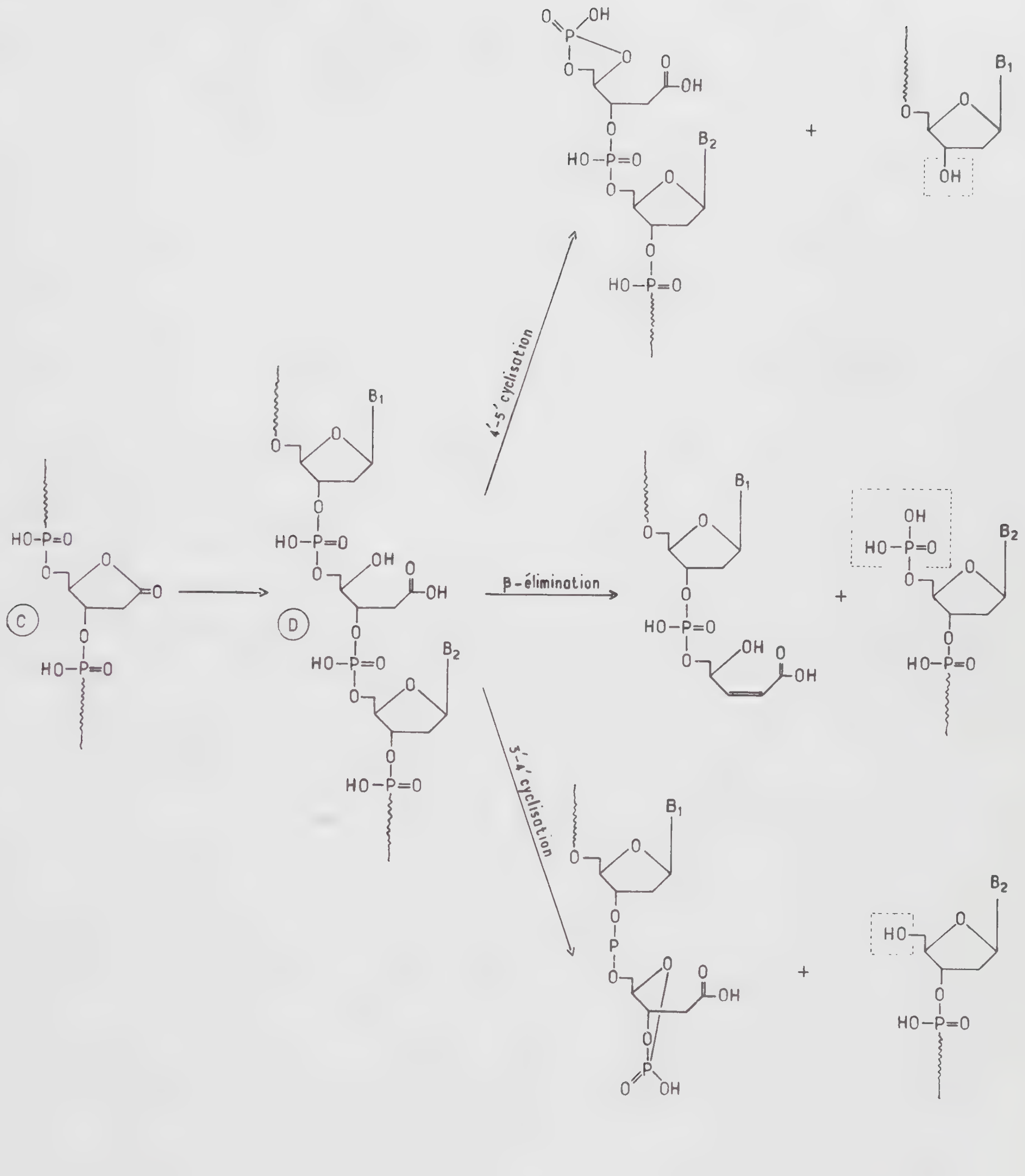


Fig. V-2 : FORMATION DE CASSURES DE CHAÎNES CONSECUTIVES A LA LIBERATION DE THYMINE PAR LE MECANISME 1].

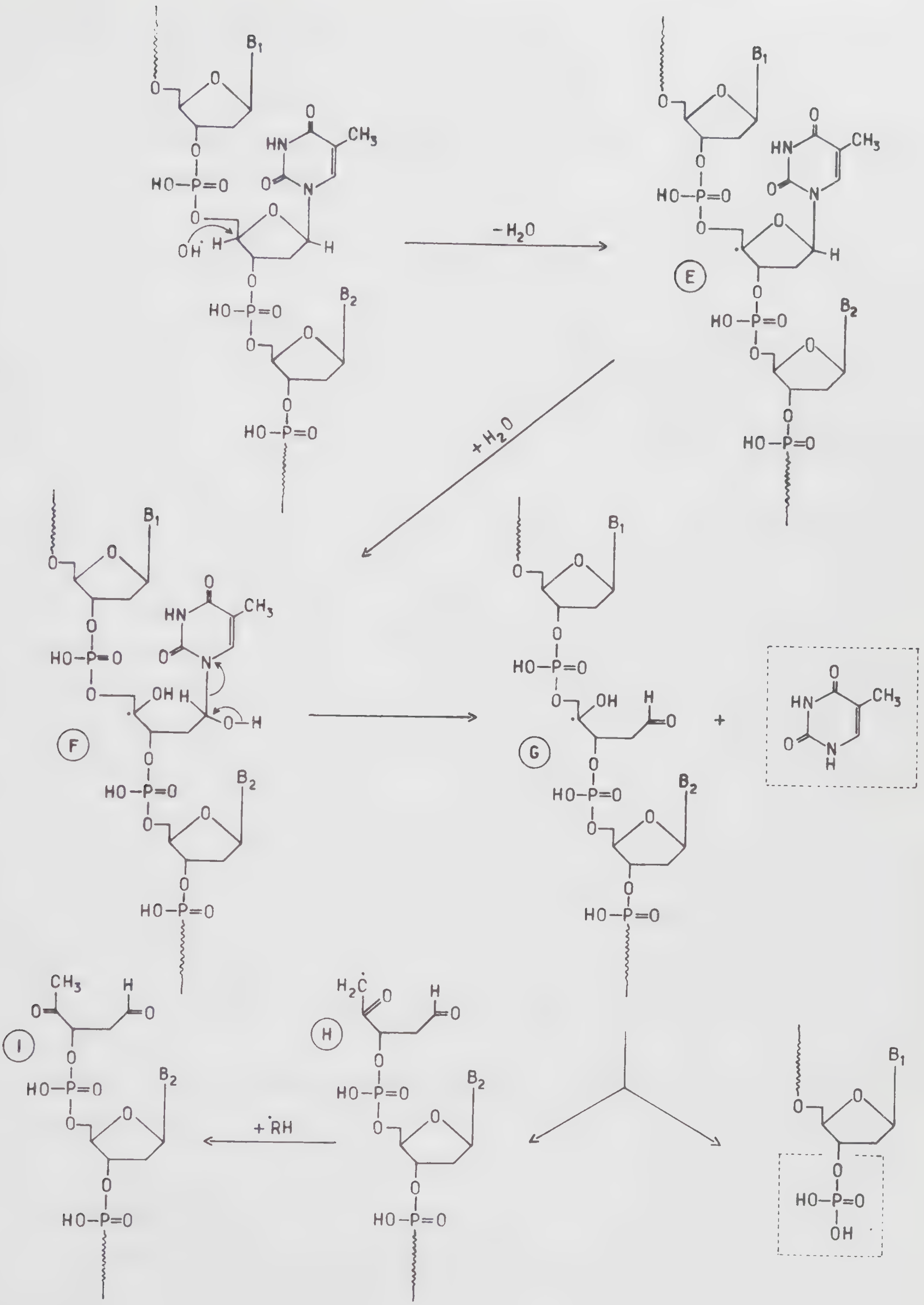


Fig. V-3 : MECANISME 2 DE LA LIBERATION DE LA THYMINE.

du phosphate-5 ribose /150/, et monosubstitué en 3' dans le cas présent. L'extrémité 5' de la cassure porte donc un résidu osidique : nous obtenons ainsi, quant à la nature chimique des extrémités des cassures, la configuration inverse de celle obtenue par la voie de β-élimination dans le mécanisme précédent.

Quelques autres mécanismes, éventuellement possibles ont été schématisés (fig. V-4) :

Le mécanisme 3| rend compte de la libération d'aldéhyde malonique parallèlement à celle de thymine. Ce schéma, proposé par KRUSHINSKAYA et coll. /89/, fait apparaître un pseudo résidu osidique sur une extrémité de la cassure et un groupement phosphate sur l'autre extrémité.

Ce mécanisme est fort contesté aujourd'hui. ULLRICH et HAGEN /166/, bien qu'ayant caractérisé la présence d'aldéhyde malonique dans la solution d'ADN irradié, pensent qu'il s'agit là d'un produit mineur, ne pouvant expliquer que pour une très faible part les cassures de chaîne consécutives à la libération de la base. Par ailleurs, HARTMANN et SONNTAG /66/ ont montré la non-spécificité de la réaction généralement utilisée pour doser ce dialdéhyde dont la recherche s'est avérée négative parmi les radioproduits de la thymidine /16,23/ ou de l'acide thymidylique /17/.

Le mécanisme 4| implique un intermédiaire, probablement instable, comportant un fragment R, non déterminé, du désoxyribose lié à la thymine (fig. V-4). DUCOLOMB et coll. /42,43/ ont observé un intermédiaire de ce type dans la radiolyse de l'acide uridylique en milieu aéré. Ce produit, comportant un fragment non déterminé du ribose lié à l'uracile, est instable et conduit à la libération d'uracile.

Il n'est pas exclu qu'un mécanisme similaire puisse se produire dans l'ADN.

En conclusion.

Les deux premiers mécanismes décrits paraissent les plus probables, ou sont tout au moins les plus vraisemblables, pour expliquer la libération de thymine (et donc des trois autres bases) dans les solutions d'ADN irradié. En effet, ils sont basés sur des constatations

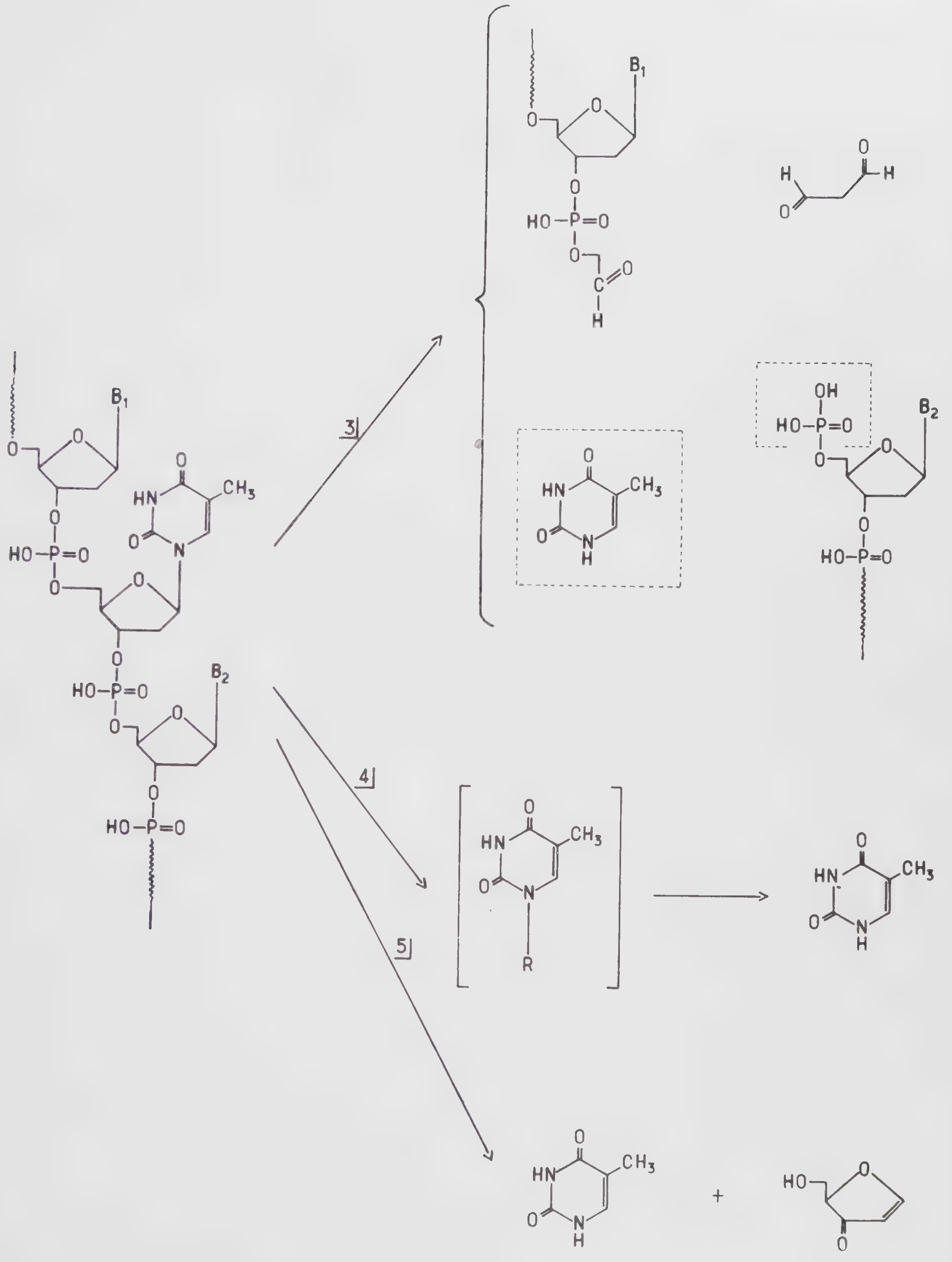


Fig. V-4 : AUTRES MECANISMES POSSIBLES DE LIBERATION DE LA THYMINE.

expérimentales effectuées au niveau des constituants élémentaires de l'ADN tels que sucre, nucléoside ou nucléotide.

Le premier interviendrait pour une part plus importante dans la mesure où les auteurs des travaux relatifs au sucre ont pu établir de façon claire, l'attaque préférentielle des radicaux $OH^{\cdot}$ sur le carbone 1' par rapport aux autres carbones, dont le 4' /66,150/.

Ces mécanismes sont intéressants car ils permettent de rendre compte, dans une certaine mesure, de certaines configurations des cassures notées par ailleurs par les auteurs des travaux relatifs à ce type de lésion. Ainsi, la présence de groupements phosphate en 5' et hydroxyl en 3' peut-elle être imputée, pour une certaine part, respectivement aux réactions de β-élimination et cyclisation 4'-5' consécutives à l'attaque en 1'. Par contre, la présence du groupement phosphate en 3' peut trouver une explication partielle dans l'enchaînement de réactions consécutif à l'attaque en 4'.

Il ne faut toutefois pas perdre de vue que ces mécanismes ne constituent que des justifications partielles à postériori de la nature chimique des cassures, et que l'on ne peut espérer rendre compte de tous les phénomènes de ruptures de chaîne par des mécanismes éliminant la base dans un premier temps /166/ : beaucoup de cassures se produisent sans perte de la base.

2 ème P A R T I E

PRODUITS DE LA CHAINE

INTRODUCTION

L'étude des produits de radiolyse du fragment thymidylique de l'ADN éliminés de la chaîne polynucléotidique nous a conduit, par le biais des hypothèses émises sur les mécanismes de leur libération, à conserver pour la majorité d'entre eux un doute quant à leur provenance effective. On pouvait envisager tout aussi bien une radiolyse de la thymine libérée qu'une radiolyse réelle du fragment thymine inséré dans la chaîne, pour expliquer la présence des composés en question.

Il nous a paru indispensable, pour lever l'ambiguité, de mettre au point des méthodes d'hydrolyse douce de la chaîne, de manière à libérer les bases éventuellement modifiées par l'irradiation tout en respectant au mieux leur intégrité.

Nous avons pu ainsi détecter la présence des principaux radioproduits dans deux types d'hydrolysat : formique d'une part, enzymatique d'autre part /156/.

Ceci était intéressant dans l'optique évoquée plus haut, mais aussi dans la mesure où la présence de certains produits de radiolyse a été récemment mise en évidence, mais de façon indirecte, sur la chaîne d'ADN irradié /63,64,107/, ce qui permet une confrontation constructive des deux types de résultats.

CHAPITRE VI

HYDROLYSE DE L'ADN IRRADIE EN SOLUTION AQUEUSE AEREE

VI.1 - ETUDE DES CONDITIONS OPTIMALES D'HYDROLYSE ACIDE.

Il ne pouvait être question, dans les délais impartis, de mener une étude exhaustive de toutes les conditions d'acidité (nature et concentration de l'acide), de température et de durée. Nous avons procédé ainsi :

Dans un premier temps, les principaux acides usuels ont été testés à l'état pur et à hautes températures (> 125°C). En effet, le seul point de départ que nous possédions était les conditions d'hydrolyse de l'ADN intact en vue d'une libération quantitative des quatre bases /27/, conditions au demeurant draconniennes. Parmi les acides testés, l'acide formique s'est rapidement révélé être le plus approprié pour des raisons dont nous reparlerons plus loin.

Les conditions d'acidité ont été ensuite étudiées et réduites volontairement au nombre de deux *(vide infra)*.

Il restait à déterminer la température et la durée de l'hydrolyse. Nous avons testé une gamme de températures décroissantes parmi lesquelles une a été sélectionnée, semblant correspondre au mieux à nos exigences qualitatives et quantitatives. La durée a été fixée après étude des courbes de libération d'un produit donné en fonction du temps d'hydrolyse.

VI.1.1 - *Nature de l'acide.*

Les acides usuels suivants ont été testés à des températures comprises entre 125°C et 175°C et pour une durée d'hydrolyse de 1 h 30. Il s'agit de : $HClO_4$ 11,7 N ; HBr 10 %, HCl 12N ; H_2SO_4 36 N ; HNO_3 22,4 N ; H COOH 26 N

Parmi eux, l'acide formique pur s'est avéré très vite le plus valable d'une part au vu des premiers résultats qualitatifs obtenus, d'autre part à cause de son élimination facile, sans neutralisation.

VI.1.2 - *L'acide formique.*

VI.1.2.1 - *Influence de la température.*

Pour une durée fixée à 1 h 30, l'hydrolyse formique a été étudiée aux températures suivantes : 175°C, 150°C, 125°C, 110°C, 100°C, 90°C, 80°C, 60°C, 40°C, 20°C, 0°C.

Nous avons observé, avec la diminution de la température, un abaissement notable de l'importance des dérivés secondaires, très sensible entre 175° et 90°, mais aussi une chute de la quantité des radioproduits primaires libérés par l'hydrolyse.

Il nous a paru raisonnable de porter notre choix sur la valeur de 90°C présentant l'avantage d'entraîner d'une part une dégradation et une transformation des composés moins importantes qu'à des températures plus élevées, et d'autre part une hydrolyse plus complète des produits radioformés par rapport à des températures inférieures.

VI.1.2.2 - *Influence de l'acidité.*

Les concentrations décroissantes en acide testées à 90°C pour une durée d'hydrolyse de 1 h 30 ont été les suivantes :

100 % = 26 N ; 50 % ; 10 % ; 5 % ; 1 % ; 0,5 % ; 0,1 % = 0,026 N

Cette étude a mis en évidence l'importance du facteur acidité dans la dégradation ou la transformation des produits radioformés en dérivés secondaires, en relation avec la stabilité intrinsèque de la substance dans le milieu hydrolytique.

Ainsi pour les dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine, l'acide formique 100 % - 26 N convient parfaitement, alors que pour l'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne ou l'acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique, il faut réduire la concentration à 1 % soit 0,26 N en acide formique. Cela permet, par exemple, de minimiser la déshydratation de l'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne en méthylène-hydantoïne.

VI.1.2.3 - *Influence de la durée.*

Il s'est avéré rapidement que le facteur temps permettait d'améliorer le rendement de l'hydrolyse en produits de radiolyse libérés dans leur intégrité, sans pour antant augmenter de façon trop gênante l'importance des composés secondaires. La formation de ces derniers semble en effet beaucoup plus sensible au facteur acidité *(vide supra)* et au facteur température.

Le problème était d'arriver à obtenir, en traçant la courbe représentant la quantité libérée d'un composé donné (exemple : les glycols) en fonction de la durée de l'hydrolyse, un "plateau" ou tout au moins un infléchissement suffisamment important de la courbe pour être en mesure d'affirmer qu'à partir du temps t, une fraction importante (90 %, 95 %, 99 % ...) du produit avait été libérée. A cet effet, des gammes croissantes de durées d'hydrolyse (0 à 90 minutes, 40 à 300 minutes, 1 h à 48 heures) ont été étudiées, et ce, à une concentration d'acide fixée, correspondant à la substance à éliminer de la chaîne.

L'apparition des dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine dans HCOOH - 26N - 90°C au cours de la gamme 1 h à 48 h (fig. VI-1), et l'apparition du mélange hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne/acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique dans HCOOH - 0,26N-90°C au cours de cette même gamme (fig. VI-2) nous a permis de conclure. Dans les deux cas, nous avons pu constater que 16 heures est la durée d'hydrolyse optimale dans la mesure où la majorité du produit (environ 90 %) a été éliminée de la chaîne au bout de ce temps.

Pour des raisons pratiques évidentes, il faut se limiter à une durée correspondant à un rendement d'hydrolyse acceptable (et connu), ce qui est le cas pour la valeur 90 %. Il faudrait prolonger l'hydrolyse bien au-delà de 16 heures pour gagner seulement quelques pourcents supplémentaires.

VI.2 - PRODUITS LIBERES PAR L'HYDROLYSE : ETUDE QUALITATIVE.

L'hydrolyse formique de la chaîne d'ADN irradié en milieu aqueux aéré donne lieu à l'apparition d'un nombre important de substances dans le milieu réactionnel (fig. VI-3).

Parmi celles-ci, nous avons reconnu les principaux produits de radiocoupure de la liaison glycosylamine caractérisés dans le chapitre III. Les autres composés sont des produits dits "secondaires" résultant généralement d'une décomposition ou d'une transformation des radicproduits primaires. Nous n'avons pu en identifier que deux pour les raisons que nous évoquerons plus loin *(vide infra)*.

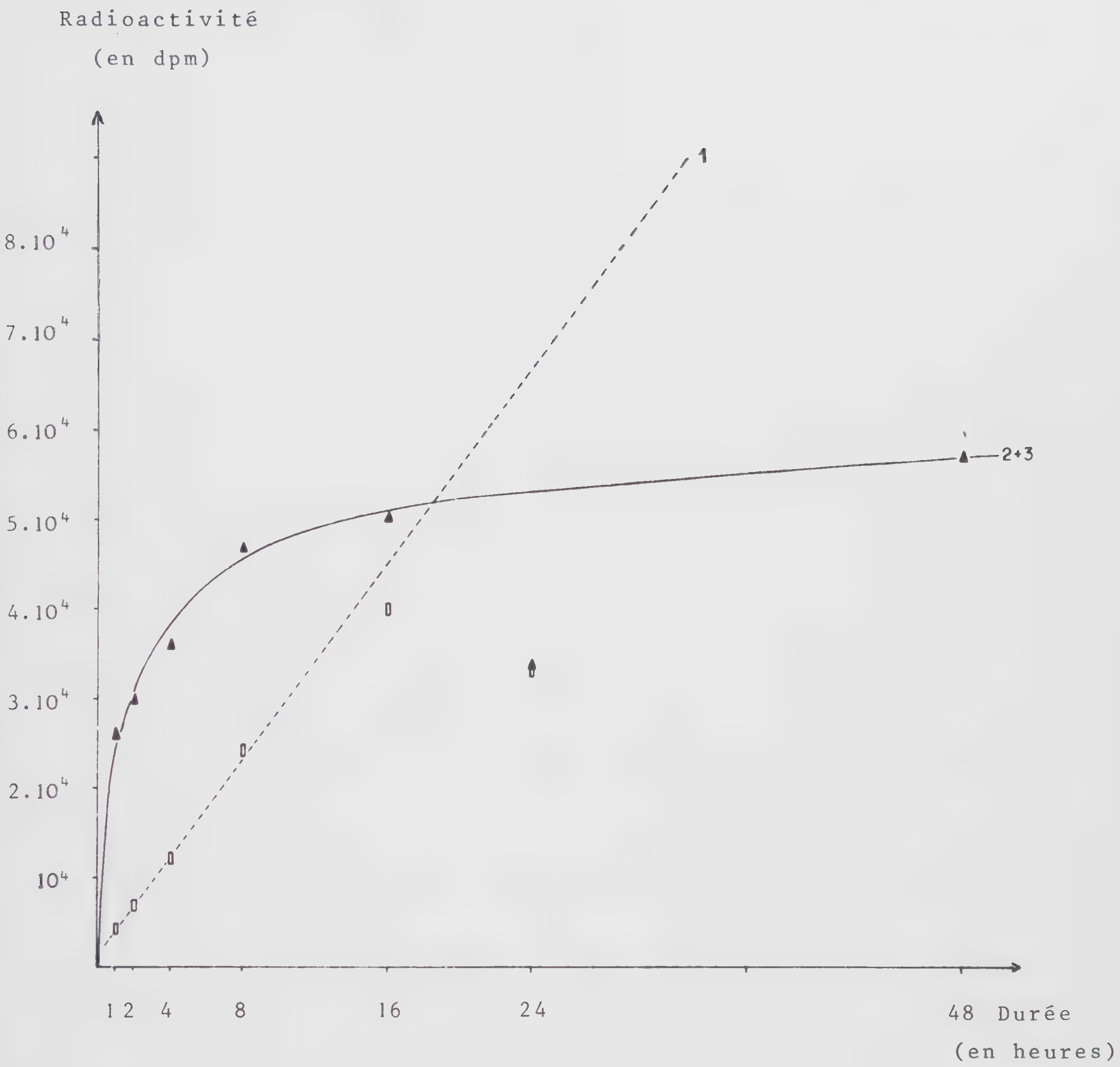


Fig. VI-1 : LIBERATION DES DIHYDROXY-5,6 DIHYDRO-5,6 THYMINE PORTES PAR LA CHAÎNE POLYNUCLEOTIDIQUE DE L'ADN IRRADIE EN CONDITIONS AEREE EN FONCTION DE LA DUREE DE L'HYDROLYSE FORMIQUE.

1 = thymine ; 3 = dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis* ;
4 = dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *trans*.

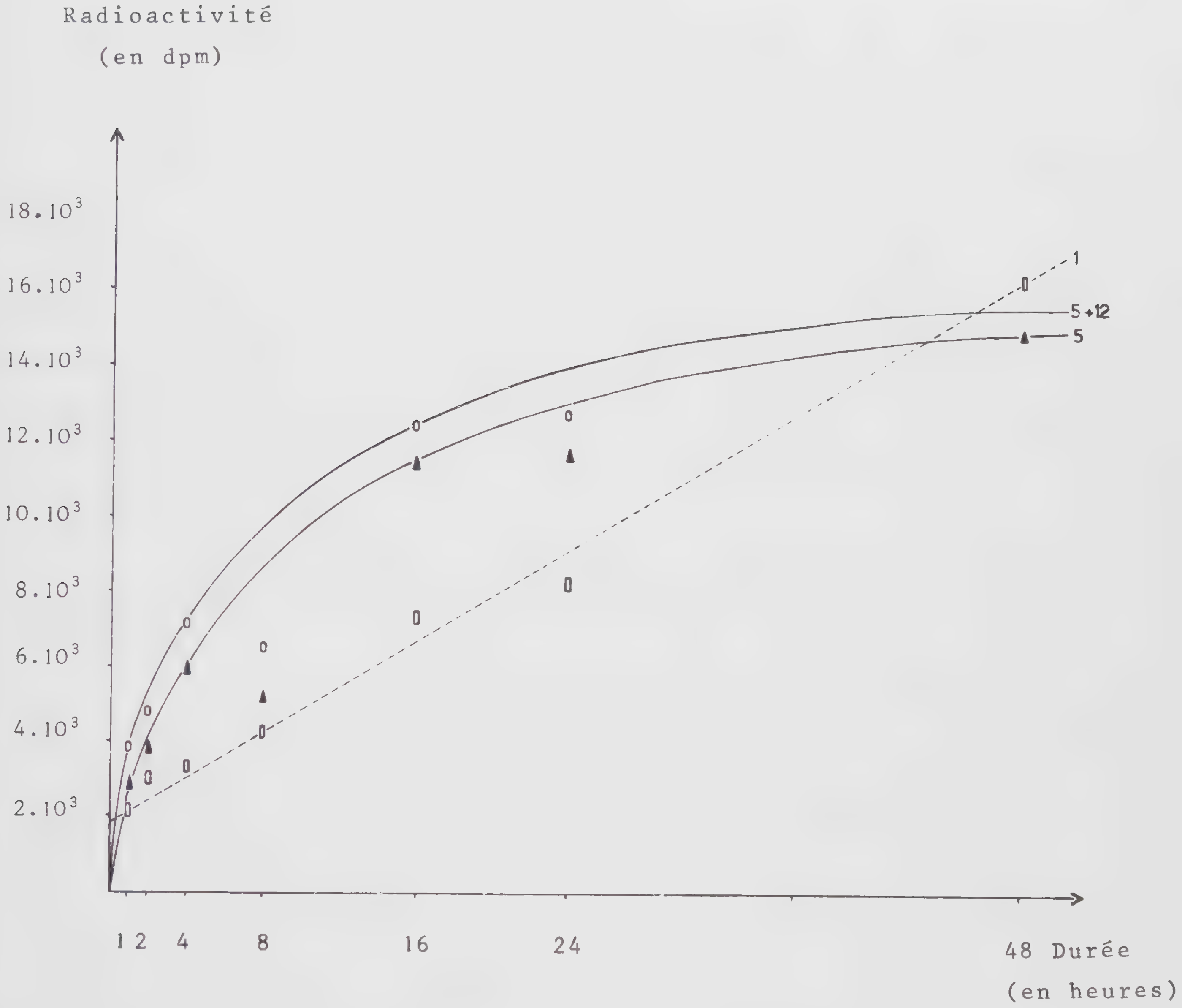


Fig. VI-2 : LIBERATION DE L'HYDROXY-5 METHYL-5 HYDANTOÏNE ET DE L'ACIDE HYDROXY-5 METHYL-5 BARBITURIQUE PORTES PAR LA CHAÎNE POLYNUCLEOTIDIQUE DE L'ADN IRRADIE EN CONDITION AEREE EN FONCTION DE LA DUREE DE L'HYDROLYSE FORMIQUE.

1 = thymine ; 5 = hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne ; 6 = acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique; 12 = méthylène-hydantoïne.

VI.2.1 - Produits de radiolyse.

Nous avons pu identifier les composés radioformés suivants dans les hydrolysats formiques (fig. VI-3 et III-2) :

- thymine [1]
- dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis* et *trans* [3,4]
- acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique[6]
- hydroxy-5 méthyl-5 hydantoîne [5]
- formylurée [14]

VI.2.1.1 - Thymine [1]

L'hydrolyse de l'ADN* irradié par l'acide formique 26 N (90°C - 16 heures) libère une quantité importante de thymine non modifiée, ce qui est normal puisque ces conditions sont relativement proches de celles utilisées pour hydrolyser l'ADN non irradié, en vue du dosage ses quatre bases constitutives (H COOHpur - 175°C - 1 h 30) /27/.

C'est un produit immédiatement identifié par sa forte absorption UV sur le chromatogramme (les R_f sont donnés tableau I).

VI.2.1.2 - Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine cis [3]

La position chromatographique du produit [3] dans les différents systèmes de solvants (tableau I) est en parfaite correspondance avec les R_f observés pour le glycol *cis* de référence et le glycol *cis* de coupure directe.

La microréaction au métaperiodate, déjà utilisée (fig. III-3), nous a permis une nouvelle fois de caractériser sans ambiguité le produit testé, par une parfaite correspondance entre les révélations autoradiographique et colorée de la formyl-N pyruvyl-N' urée obtenue (tableau I).

VI.2.1.3 - Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine trans [4]

La chromatographie du composé [4] dans les différents systèmes de solvants, en présence de glycol *trans* témoin , est déjà significative d'après la coïncidence de la révélation autoradiographique avec les deux détections colorées possibles, et ce, aux R_f indiqués tableau I.

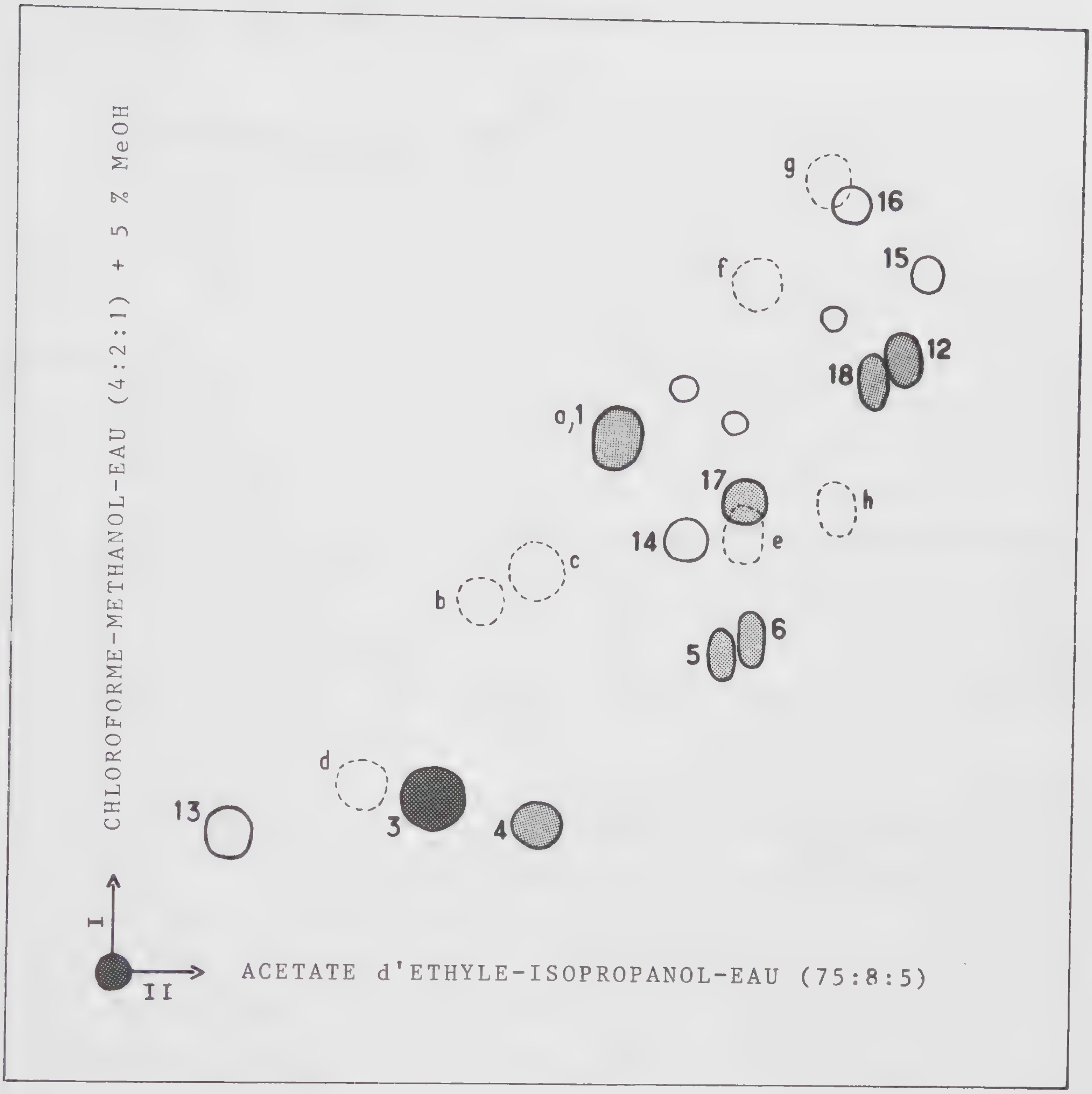


Fig. VI-3 : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE SILICE MN-N-HR DE L'HYDROLYSAT DE LA CHAÎNE D'ADN IRRADIEE EN SOLUTION AQUEUSE AEREE.

1 = thymine ; 3 = dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis* ; 4 = dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *trans* ; 5 = hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne ; 6 = acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique ; 12 = méthylène-hydantoïne ; 13 = urée ; 14 formylurée.

a = thymine ; b = thymidine ; c = uracile ; d = uridine ; e = fluoro-5 uracile ; f = acétyl-3' thymidine ; g = diacétyl-3'5' thymidine ; h = bromo-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine.

L'isomérisation du glycol *trans* en glycol *cis* dans les conditions précédemment décrites s'est avérée positive (fig. III-4, tableau I).

Isomérisation cis/trans en milieu formique dilué.

Un intérêt secondaire de l'étude des conditions d'acidité de H COO H réside dans la constatation suivante : en milieu formique concentré (100 %), les glycols sont libérés dans des proportions semblables à celles observées lors de l'étude des produits de coupure, en l'occurence la forme *cis* étant nettement plus importante que la forme *trans* ; en milieu formique dilué (1 % ou 0,1 %) la forme *trans* devient autant sinon plus importante que la forme *cis*.

Il s'avère donc que le chauffage en milieu formique dilué d'un glycol de forme *cis* entraîne une isomérisation partielle en forme *trans*. Ce phénomène, qui a pu être vérifié sur des glycols de thymine de synthèse, constitue une technique nouvelle et intéressante d'isomérisation *cis/trans* et peut, en particulier, être considéré comme une microréaction possible de caractérisation des glycols issus d'une irradiation d'ADN.

VI.2.1.4 - Acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique [6] et hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne [5]

Ces deux radioproduits ont été identifiés par leur position chromatographique (tableau I) et, en particulier, dans le cas où l'on a pu observer leur séparation directe sur silice sous forme de deux taches "jumelles" caractéristiques (fig. VI-3).

VI.2.1.5 - Formylurée [14]

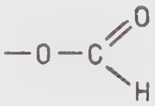
La présence de cet uréide a été détectée autoradiographiquement sur le chromatogramme d'un hydrolysat formique d'ADN marqué sur le carbone 2 de la thymine (fig. VI-3). Les R_f sont en correspondance avec ceux du produit témoin révélé au PDAB (tableau I).

Cette présence, si elle confirme le résultat obtenu avec le même type d'ADN au niveau des produits de radiocoupure, peut surprendre quand on connaît la tendance de la formylurée à se dégrader en urée en milieu acide. En fait, il faut considérer que dans le cas présent, cette substance se trouve dans l'acide formique, ce qui implique probablement une compétition ou un équilibre entre la réaction de formylation et la réaction de dégradation.

VI.2.2 - Produits secondaires dûs à l'hydrolyse.

On peut inclure sous cette dénomination les substances numérotées [12], [13], [15], [16], [17], [18]. Elles résultent d'une dégradation ou d'une transformation des radioproduits primaires dans le milieu acide concentré et chaud. Il est même permis de penser que certaines d'entre elles sont des dérivés résultant d'une réaction entre certains produits radioformés et l'acide formique ou, de façon plus précise, des dérivés portant des groupements fonctionnels formylés.

Ainsi peut-on imaginer pour la structure des dérivés [15], [16], [17], [18] en particulier, un cycle pyrimidique (ou autre) portant des groupements



Ces assertions peuvent être envisagées à la lumière des constations expérimentales suivantes :

Les produits précédemment cités ont un comportement chromatographique caractérisé par de hautes valeurs de R_f ($R_f > 0,6$ dans le solvant I ; $R_f > 0,8$ dans le solvant II) (fig. VI-3). Il est bien connu au laboratoire que les bases et nucléosides acétylés ou toluylés ont un comportement voisin /16/. Or un groupement tel que le groupement formyl a une polarité analogue à celles des groupements acétyls et toluyls ; il est donc raisonnable de penser que des composés formylés aient une position chromatographique voisine de celle de composés acétylés, et par suite, d'émettre les hypothèses précédentes sur la structure des dérivés secondaires à hauts R_f.

Les identifications purement comparatives de ces composés sont compliquées par le fait que la qualité de leur séparation dans la zone de R_f considérée est très aléatoire (fig. VI-3) et peu répétitive. Il s'est donc avéré utile de mettre au point un système de solvants assurant une séparation sans ambiguité de ces dérivés.

Les solvants V' et VI', couramment employés pour la séparation des nucléosides acétylés /16/, ont été testés. L'amélioration observée nous a conduit à envisager des modifications en nature et en quantité dans leurs compositions. De la série d'essais effectués, les compositions V et VI sont apparues très convenables compte tenu

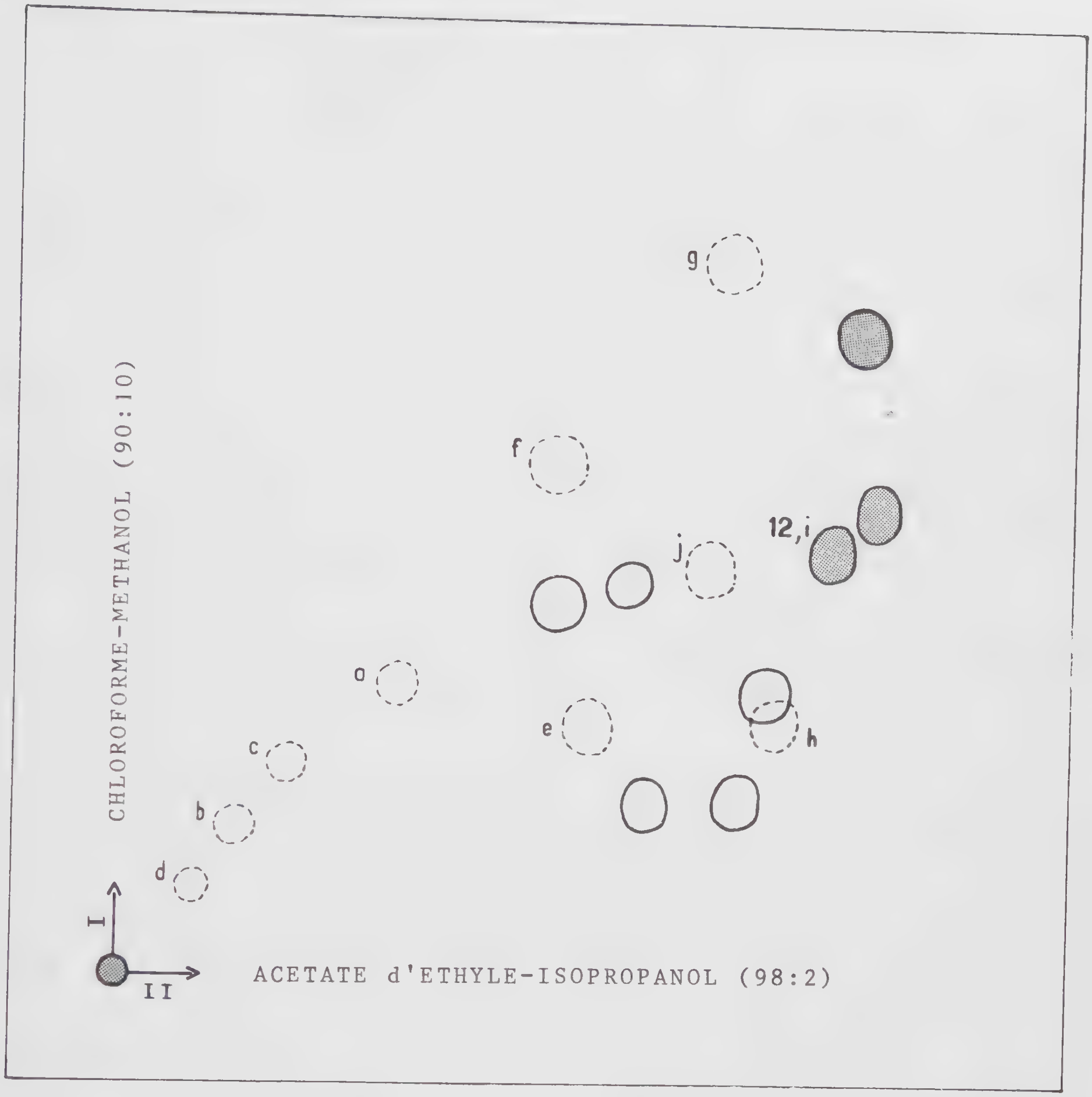


Fig. VI-4 : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE SILICE MN-N-HR DERIVES SECONDAIRES DUS A L'HYDROLYSE FORMIQUE DE LA CHAÎNE D'ADN IRRADIE EN SOLUTION AQUEUSE AEREE.

12 = méthylène-hydantoïne.

a = thymine ; b = thymidine ; c = uracile ; d = uridine ; e = fluoro-5 uracile ; f = acétyl-3' thymidine ; g = diacétyl-3'5' thymidine ; h = bromo-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine ; i = méthylène-hydantoïne ; j = bromo-5 isoamyloxy-6 dihydro-5,6 thymidine.

de l'excellente dispersion des taches obtenue (fig. VI-4).

Les chromatographies effectuées dans ces derniers systèmes de solvants ont permis, en outre, de mettre en évidence la fragilité probable de certains des composés séparés de la sorte. Ainsi, des produits supplémentaires apparaissent-ils pendant la période s'écoulant entre la visualisation des dérivés secondaires dans les solvants I et II (fig. VI-3) et leur séparation complète dans les solvants V et VI. (fig. VI-4).

L'identification complète et précise de la structure des dérivés secondaires ne peut être envisagée à partir des quantités de telles substances libérées par l'hydrolyse formique de l'ADN. Cette étude n'est possible qu'au niveau de la base ou du nucléoside et sera discutée en VI.4.2.

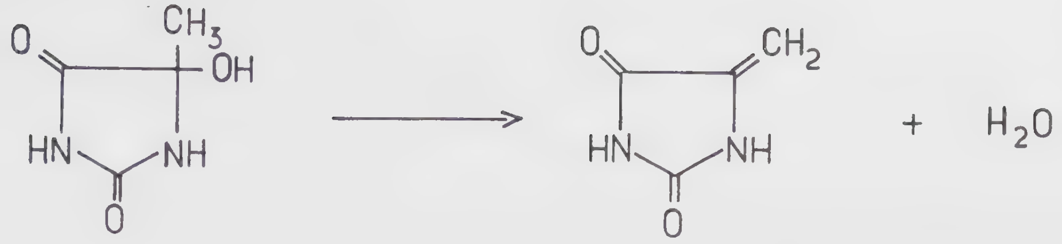
Néanmoins, nous avons pu déterminer parmi l'ensemble des dérivés secondaires deux substances intéressantes, et ce, par des méthodes chromatographiques.

Méthylène-hydantoïne [12]

La substance [12] a été identifiée à la méthylène-hydantoïne d'après sa position chromatographique dans les solvants I et II (fig. VI-3 ; tableau I) en parfaite coïncidence avec le produit témoin. La très forte absorption UV de ce composé permet même de cette façon, dans certains cas, la visualisation directe des quantités pourtant extrêmement faibles libérées par l'hydrolyse.

De plus, la révélation autoradiographique du composé [12] chromatographié dans les solvants V et VI est en parfaite correspondance avec la révélation UV du produit de référence (fig. VI-4).

La présence de méthylène-hydantoïne dans l'hydrolysat formique n'est pas faite pour surprendre dans la mesure où l'acide formique chaud déshydrate l'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne libérée par l'hydrolyse [112].



<u>*Urée* [13]</u>

Ce produit apparaît en quantité relativement importante au cours de l'hydrolyse formique puisque la pulvérisation du chromatogramme par le PDAB fait apparaître une coloration jaune très nette au niveau de l'urée dont les R_f sont donnés par ailleurs (tableau I ; fig. VI-3).

Elle n'est pas révélable par autoradiographie puisque le carbone uréidique est le carbone 2 du cycle pyrimidique initial.

Cette substance constitue l'étape ultime de la dégradation des produits de radiolyse en milieu acide concentré.

Les autres dérivés secondaires restent donc à déterminer.

Il semblerait, d'après les premiers résultats obtenus au laboratoire sur l'étude du comportement en milieu formique de chaque base modifiée, que le produit [15] soit un dérivé de modification de l'acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique, et la substance [16] un dérivé de transformation des dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine.

VI.3 - ESSAI D'ANALYSE QUANTITATIVE DES PRODUITS DE LA CHAINE.

VI.3.1 - *Dosage des dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine*.

L'étude de la courbe de libération des glycols de thymine en fonction de la durée d'hydrolyse (fig. VI-1) nous amène à constater qu'au bout de 16 heures (hydrolyse considérée comme totale), la radioactivité globale des glycols représente environ 1/10ème de l'activité totale de l'ADN.

Il apparaît donc que pour une dose d'irradiation de 300 Krads, un di ième des bases thymine est transformé en glycols *cis* et *trans*. Ces derniers sont donc de loin les radioproduits majeurs portés par la chaîne polynucléotidique.

VI.3.2 - *Dosage de l'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne et de l'acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique.*

De la même façon que précédemment, on peut estimer que pour une dose de 300 Krads, environ le vingtième des bases thymine se trouve sous forme d'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne ou d'acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique.

VI.3.3 - *Etude de l'effet de la dilution.*

Les courbes représentatives de l'effet de la dilution de l'ADN dans la solution irradiée sur la libération des glycols de radiocoupure d'une part, sur la formation de glycols sur la chaîne d'ADN d'autre part (ces derniers étant dosés par hydrolyse formique), ont été portées figure VI-5.

La dilution de la solution d'ADN induit une augmentation des produits de radiolyse et la diminution de la thymine.

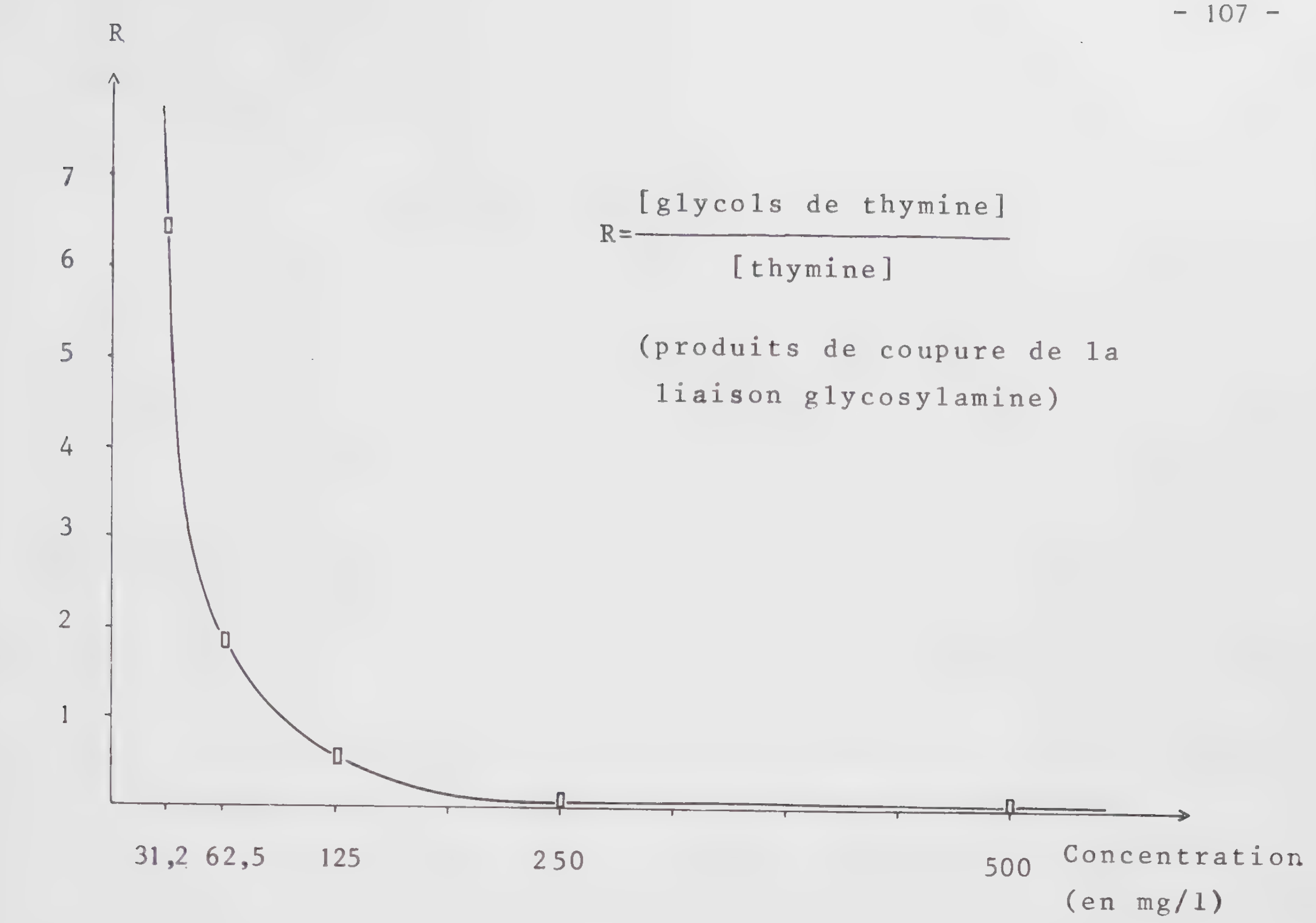
Le résultat était prévisible. En effet, il est bien connu que l'augmentation du rapport soluté sur solvant favorise la formation de radicaux issus de la radiolyse du solvant et, par conséquent, l'attaque du soluté par ces radicaux.

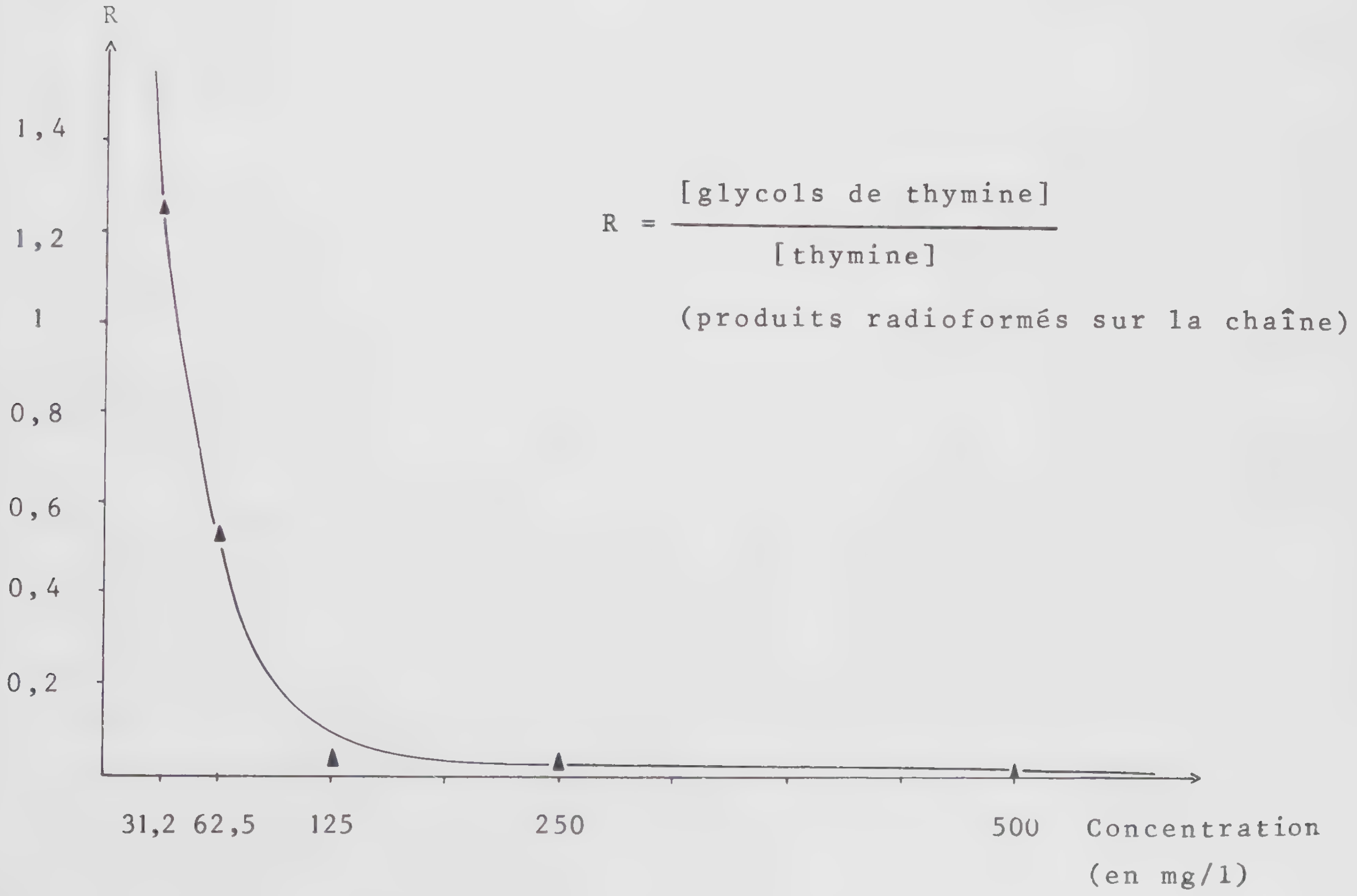
VI.3.4 - *Etude de l'effet de sel.*

Les études menées à ce sujet ne sont que des études préliminaires qui ont eu pour but de donner une idée de l'influence d'un milieu salin sur la dégradation de l'ADN sous rayonnement.

Des essais systématiques restent à effectuer en ce domaine pour préciser et chiffrer les premières constatations observées, et savoir dans quelle mesure elles peuvent être étendues à d'autres types de sels.

Il apparaît néanmoins que le chlorure de sodium 10^{-3} M exerce un effet radioprotecteur. Par contre, le mélange tampon Na_2HPO_4/NaH_2PO_4-10^{-3} M-pH = 7 semble ne pas affecter la radiosensibilité de l'ADN.





<u>Fig. VI-5</u> : EFFET DE LA DILUTION DE L'ADN PENDANT L'IRRADIATION SUR LA FORMATION DES PRODUITS DE RADIOLYSE.

VI.4 - DISCUSSION.

VI.4.1 - *Critique de la méthode.*

La mise au point de conditions d'hydrolyse acceptables s'est avérée difficile car, si la saturation de la double liaison 5-6 induit une fragilité accrue de la liaison N-glycosidique, les dérivés de saturation de la base correspondants sont susceptibles de dégradation ou modification en milieu acide. La difficulté réside donc moins dans l'obtention de la rupture de la liaison N-glycosidique que dans la préservation de l'intégrité des produits de radiolyse.

C'est pour cette raison que les conditions classiques d'hydrolyse de l'ADN -H COOH ou $HClO_4$ à 175°C- se sont avérées inutilisables.

Parmi tous les acides testés, le choix de l'acide formique répond à plusieurs exigences :

- Il a été le seul à donner des premiers résultats qualitatifs appréciables (détection des glycols) pour des conditions réactionnelles (125° à 175°C ; 1 h 30) avec lesquelles les autres acides conduisaient essentiellement à l'obtention d'urée, étape ultime de dégradation des radioproduits.

- Une bonne résolution chromatographique, plus particulièrement dans le cas de produits à l'état de traces, nécessite une élimination parfaite de toutes traces d'acide avec lequel le mélange à analyser a pu être en contact.

Les acides usuels sont éliminés par neutralisation, ce qui conduit à la formation de sels dans le milieu. Ces derniers sont généralement légèrement solubles dans les solvants utilisés (alcool ou acétone) ce qui perturbe par la suite l'élution chromatographique. D'autre part, la fraction insoluble du sel "piège" les traces de radioproduits, ce qui entraîne des pertes considérables.

Nous avons effectué quelques tentatives d'élimination par résine échangeuse d'ions ; la technique est intéressante en elle-même, dans la mesure où l'on élimine le problème de solubilité partielle des sels dans les solvants, mais s'avère inutilisable dans le cas présent car les microquantités de produits sont "piégées" par la résine.

L'acide formique ne nécessite aucune neutralisation car il est facilement entraînable à l'eau : les problèmes précédents ne se posent donc pas et c'est par conséquent l'acide le plus approprié parmi les acides usuels.

La mise au point des conditions réactionnelles optimales avec l'acide choisi a été un problème beaucoup plus délicat que le choix de l'acide lui-même. Il paraît, en effet, pratiquement impossible de trouver des conditions expérimentales pour lesquelles l'hydrolyse est totale et s'effectue sans dégradation des radioproduits primaires en dérivés secondaires. Il convient donc de trouver des compromis tenant compte au mieux de ces deux critères. En outre, il est hors de question d'espérer trouver des conditions qui conviendraient pour tous les produits : la nécessité d'utilisation de conditions bien définies pour chaque type de produit de radiolyse s'est très vite imposée.

Les critères expérimentaux mis au point pour les dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine -H COOH 26 N/90°C/16 heures- ainsi que pour l'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne ou l'acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique -H COOH 0,26 N/90°C/16 heures- semblent répondre au mieux à l'ensemble des remarques précédemment émises.

Notons au passage que le facteur temps n'est pas un inconvénient majeur au niveau de l'autoradiolyse éventuelle puisque l'acide formique est un capteur de radicaux $OH^{\bullet}$. Ceci est à retenir car, à l'avenir, il pourra être judicieux de jouer sur ce facteur temps pour pallier à un abaissement de la température ou de l'acidité rendu nécessaire dans le cas d'un radioproduit à hydrolyser ayant tendance à se dégrader dans des conditions plus rigoureuses. Cela a été le cas pour les deux derniers produits cités *(vide supra)*.

La reproductibilité de la méthode, d'après le test préliminaire effectué sur une substance marquée isolée, de radioactivité connue, peut être évaluée à 5 % et paraît donc assez bonne.

Cette technique d'hydrolyse formique permet donc la détermination qualitative et le dosage quantitatif des principaux produits de radiolyse portés par la chaîne. Il faut toutefois être conscient de ses limites : on ne peut espérer détecter par cette voie des substances instables telles que la formyl-N pyruvyl-N' urée ou l'hydrate de thymine (radioproduit des conditions désaérées).

Ces réserves émises, nous pensons que cette méthode d'analyse directe, bien que techniquement encore assez complexe, paraît plus fiable que le dosage indirect par l'intermédiaire du borohydrure /63,64,107/ déjà évoqué dans les précédents chapitres.

En effet, l'hydrolyse formique, dont la technologie est susceptible d'être améliorée, simplifiée dans l'avenir, présente l'énorme avantage d'être directe et sélective.

La méthode décrite par CERUTTI nous semble peu spécifique : le borohydrure peut réduire un certain nombre de radioproduits de la thymine, dont les glycols, les peroxydes et, peut-être, l'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne /64/. Le dosage du méthyl-2 glycérol résultant représente donc tout au plus une mesure partielle de la dégradation de la thymine et ne rend en aucun cas compte de la nature du ou des produits effectivement réduits par $NaBH_4$.

Quant à la technique de mesure de la quantité d'eau tritiée, utilisée par le même auteur /128,129,152/, elle paraît efficace et assez spécifique, mais ne permet justement d'évaluer que l'attaque du groupement méthyl par les radicaux $OH^{\cdot}$, conduisant éventuellement à la formation d'hydroxyméthyl-5 uracile.

La méthode que nous avons mise au point paraît donc supérieure, même en tenant compte du fait que des améliorations devront y être apportées :

- Le problème de la reproductibilité, qui n'a été qu'entrevu, demande à être étudié rigoureusement. Si cela s'avère nécessaire, des solutions allant de pair avec une simplification du protocole expérimental pourront être précisées.

- L'étude de l'autoradiolyse, qui ne se pose d'ailleurs pas seulement au niveau de l'hydrolyse, devra être approfondie car cela paraît être un phénomène important, qui dans certains cas a rendu inexploitables certaines études quantitatives. D'après les premiers résultats obtenus, il semblerait que la dilution de la solution d'ADN durant l'irradiation, en augmentant la radiosensibilité et en diminuant l'autoradiolyse, pourrait pallier aux perturbations occasionnées par cette dernière.

- L'existence de dérivés secondaires, due à la nature de l'acide et aux conditions réactionnelles dans lesquelles il opère, ne saurait remettre en cause la validité de la méthode dans l'optique de dosages quantitatifs. Seules les substances [12], [17] et [18] sont d'une importance notable. En outre, il pourra être aisément tenu

compte de ce phénomène (Cf. VI.4.2).

VI.4.2 - Discussion des résultats.

Les principaux produits de radiocoupure stables issus des conditions aérées ont pu être retrouvés au niveau de l'hydrolyse formique de la chaîne polynucléotidique.

La présence de dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine, ainsi que de l'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne, parmi les radioproduits portés par la chaîne d'ADN irradiée *in vitro*, est à rapprocher, avec les réserves relatives à la non-spécificité de la méthode utilisée *(vide supra)*, des résultats obtenus par CERUTTI et coll. quant aux composés radioformés sur la chaîne irradiée *in vivo*. Dans un cas, les produits de radiolyse caractérisés ont été éliminés de la chaîne polynucléotidique par l'hydrolyse formique ; dans l'autre cas, ils ont été éliminés par les cellules elles-mêmes, qu'il s'agisse de bactéries *M. Radiodurans* /63,64/ ou de cellules ovariennes d'hamster /107,128/. La comparaison des deux types de résultats peut donc trouver une relative justification au niveau de ce chapitre.

Notons que nous n'avons pu détecter la présence, aussi bien parmi les substances de coupure directe que parmi les radioproduits de coupure hydrolytique, de dérivés résultant d'une oxydation du motif méthyl de la thymine. Nos résultats, sur ce point précis, sont en divergence avec ceux de ROTI ROTI et CERUTTI /128/ qui estiment que de tels composés (hydroxyméthyl-5 uracile ou formyl-5 uracile) sont libérés dans le milieu d'incubation où sont placées les cellules ovariennes d'hamster irradiées : la production d'eau tritiée, provant l'attaque du méthyl par les radicaux $OH^{\bullet}$, plaide en faveur de telles conclusions. DIverses hypothèses pourraient être invoquées pour expliquer cette divergence, mais avant tout il ne faut pas oublier que nous comparons des expériences fondamentalement différentes : dans un cas il s'agit d'ADN *in vivo*, c'est-à-dire entouré de tous les constituants cellulaires ; dans l'autre cas il s'agit d'ADN *in vitro*, en l'occurence isolé dans l'eau. La mise en parallèle des deux types de résultats ne peut donc être que d'une portée limitée.

Les radioproduits suivants n'ont pas été retrouvés dans les hydrolysats formiques : la formyl-N pyruvyl-N' urée, le pyruvamide, l'acétylurée.

Pour le pyruvamide, l'explication est évidente : l'examen de son mécanisme de formation (fig. III-10) fait clairement apparaître qu'il ne contient pas l'azote 1 du cycle pyrimidique initial. La formyl-N pyruvyl-N' urée est beaucoup trop instable pour résister à l'hydrolyse formique. En outre, son dérivé désoxyribosidique n'a pu être isolé parmi les radioproduits de la thymidine /16/ et se comporte en tant qu'intermédiaire instable. L'acétylurée est elle aussi dégradée en milieu acide.

L'intérêt d'essais d'irradiation avec un ADN marqué sur d'autres atomes de carbone de la base thymine mérite d'être souligné, et ce, tant au niveau des produits d'exclusion directe de la chaîne que des produits d'élimination hydrolytique. Cela permettrait éventuellement de compléter le schéma de dégradation sous rayonnement du motif thymidyle de l'ADN.

L'apport d'un marquage sur le C-2 pour identifier la formylurée a déjà été signalé par ailleurs. L'hydrolyse d'un ADN irradié marqué sur le C-6 pourrait être tout particulièrement riche d'enseignements. En effet, le mécanisme proposé pour rendre compte de la libération du pyruvamide (fig. III-10) implique la présence de formamide demeuré inseré dans la chaîne polynucléotidique. La détection de ce produit dans l'hydrolysat permettrait une confirmation de la véracité du mécanisme en question.

L'établissement de la structure des dérivés secondaires dûs à l'hydrolyse formique, s'il a pu être effectué dans deux cas bien particuliers (méthylène-hydantoïne et urée) n'est envisageable qu'au niveau de la base ou du nucléoside.

Cette étude, déjà ébauchée au laboratoire, risque d'être longue et aléatoire compte tenu des remarques émises au V.2.2. En fait il serait possible, dans l'avenir immédiat, de se limiter à l'établissement de corrélations bi-univoques bien précises entre les dérivés secondaires tels [15], [17], [18] et les principaux radioproduits primaires. La connaissance de ces corrélations est suffisante pour mener à terme des études quantitatives rigoureuses des principaux composés radioformés sur la chaîne et éliminés de celle-ci par l'hydrolyse.

L'effet radioprotecteur du chlorure de sodium 10^{-3} M peut être interprété :

On peut admettre qu'une solution saline favorise la conservation de la structure secondaire de l'ADN qui, comme nous l'avons vu, protège dans une certaine mesure la double liaison 5-6 de l'attaque des radicaux $OH^{\cdot}$.

Le comportement neutre du tampon phosphate peut impliquer un rôle particulier de l'ion Cl^{-} dans l'effet noté du chlorure de sodium, et peut être rapproché de travaux récents : ACHEY et DURYEA /27 ont montré que la radiosensibilité de l'ADN, quant à la production de cassures, n'est pas affectée dans une gamme de concentration en tampon phosphate dans lequel il est dissous.

CHAPITRE VII

HYDROLYSE DE L'ADN IRRADIE EN SOLUTION AQUEUSE DESAEREE

VII.1 - ETUDE DES CONDITIONS OPTIMALES D'HYDROLYSE.

La fragilité accrue de la liaison N-glycosidique, liant le sucre à une base portant des modifications du type de celles obtenues en conditions désaérées, était un phénomène connu au laboratoire au niveau du nucléoside ou du nucléotide.

Nous avons pu le vérifier au cours de l'étude des produits radioformés sur la chaîne d'ADN irradiée en conditions désaérées. Cette étude a été menée par l'intermédiaire de la voie hydrolytique.

Une technique d'hydrolyse enzymatique a été mise en oeuvre /156/ et parallèlement des essais ont été réalisés avec l'acide chlorhydrique, les observations effectuées avec ce dernier servant de témoin pour suivre l'évolution des résultats obtenus par la méthode précédente.

Par la suite, l'acide formique a été testé sous quelques conditions expérimentales qui seront évoquées.

VII.1.1 - L'acide chlorhydrique.

Les conditions suivantes de température et de durée ont été testées avec HCl N :

100°C	1 h - 2 h
80°C	3 h
70°C	16 h - 24 h
65°C	1 h - 2 h - 16 h.

Qualitativement, toutes ces conditions sont équivalentes : les principaux radioproduits du milieu désaéré se retrouvent dans l'hydrolysat excepté l'hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine.

Les études effectuées avec cet acide n'ayant eu pour but que la détermination qualitative des thymines modifiées portées par la chaîne, aucune mesure quantitative du rendement hydrolytique dans les différentes conditions n'a été effectuée. Toutefois, il semble, d'après l'intensité des spots autoradiographiques, que toutes ces conditions soient finalement assez équivalentes et par la même toutes beaucoup trop douces pour espérer une hydrolyse totale ou quantitative.

VII.1.2 - *L'acide formique.*

VII.1.2.1 - *Conditions d'acidité.*

Les produits de radiolyse radioformés en conditions désaérées étant d'une grande stabilité, la concentration 100 % = 26 N en acide convient parfaitement. Cette stabilité permet de rendre compte de la formation nettement moins importante, en nombre et en quantité, de dérivés secondaires de transformation (fig. VII-1) que ce qui a été noté dans les hydrolysats d'ADN irradié en conditions aérées.

VII.1.2.2 - *Influence de la durée et de la température.*

Les conditions suivantes ont été testées :

125°C	1 h 30
90°C	1 h 30 - 3 h - 8 h
60°C	1 h 30 - 3 h - 16 h.

Les résultats obtenus avec ces conditions sont qualitativement très voisins compte tenu qu'elles permettent toutes la libération des principaux radioproduits, exception faite pour l'hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine dont on connaît la tendance à redonner très vite la thymine par perte d'une molécule d'eau.

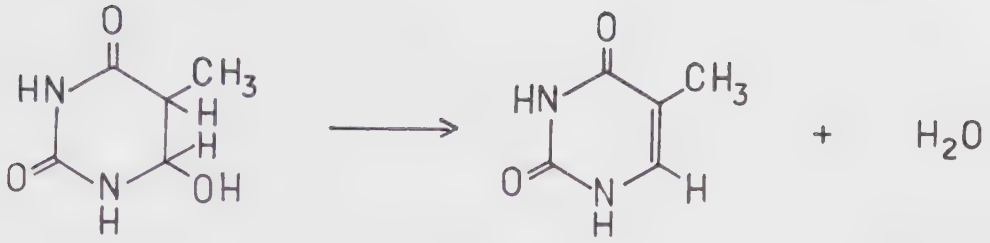


Fig. VII-3 : Déshydratation de l'hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine

Quantitativement, il semble que 60°C - 16 h ou 90°C - 8 h conviennent très bien pour la dihydro-5,6 thymine et l'hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine, les conditions optimales d'hydrolyse pour les glycols étant celles définies pour ces produits en milieu aéré.

Il ne faut cependant pas perdre de vue qu'il ne s'agit là que d'une étude préliminaire. Les conditions exactes d'hydrolyse quantitative de la dihydro-5,6 thymine et de l'hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine restent à déterminer : HCOOH 26 N - 90°C - 8 h ou HCOOH 26 N - 60°C - 16 h constituent une base de départ intéressante pour la recherche de température et durée optimales en vue de l'obtention d'un palier pour ces deux substances.

VII.1.3 - Hydrolyse enzymatique.

La technique de préparation de l'extrait enzymatique est classique et a déjà été utilisée au laboratoire /50/.

Les conditions expérimentales de l'hydrolyse enzymatique répondent à plusieurs exigences, en l'occurence :

- Le chlorure de magnésium apporte le cation divalent (Mg^{2+}) nécessaire au fonctionnement de la plupart des enzymes.
- Le tampon phosphate assure la régulation de pH dans le milieu.

- La température de 37°C est celle généralement considérée comme optimale dans les réactions enzymatiques.
- La durée de l'hydrolyse a été déterminée à partir des résultats qualitatifs obtenus avec une gamme croissante de temps de réaction.

Les avantages et les inconvénients de cette technique seront discutés en détail en VII.4.1. Notons pour l'instant la nécessité impérative d'utiliser l'extrait le plus rapidement possible après sa préparation.

Le traitement de l'ADN irradié, dans des conditions de milieu identiques à celles de l'hydrolyse enzymatique, mais sans addition d'extrait, induit également dans certains cas la libération de thymines modifiées, mais en quantité nettement moins importante. L'explication demeure obscure : on peut concevoir une dialyse de post-irradiation imparfaite, mais aussi une certaine hydrolyse de l'ADN dans la solution aqueuse à 37°C. Ce phénomène demeure suffisamment mineur pour ne pas remettre en question le principe même de l'hydrolyse enzymatique, ainsi que les résultats obtenus.

VII.2 - PRODUITS LIBERES PAR HYDROLYSE ACIDE : ETUDE QUALITATIVE.

L'hydrolyse acide, en milieu formique ou éventuellement chlorhydrique, de la chaîne d'ADN irradiée en conditions désaérées, donne lieu à l'élimination des principaux radioproduits stables correspondants, ainsi que de quelques dérivés secondaires.

VII.2.1 - Produits de radiolyse.

La présence des radioproduits suivants a été décelée dans les hydrolysats (fig. VII-1 et III-2) :

- Thymine [1]
- Dihydro-5,6 thymine [8]
- Hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine [9]
- Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis* et *trans* [3,4]

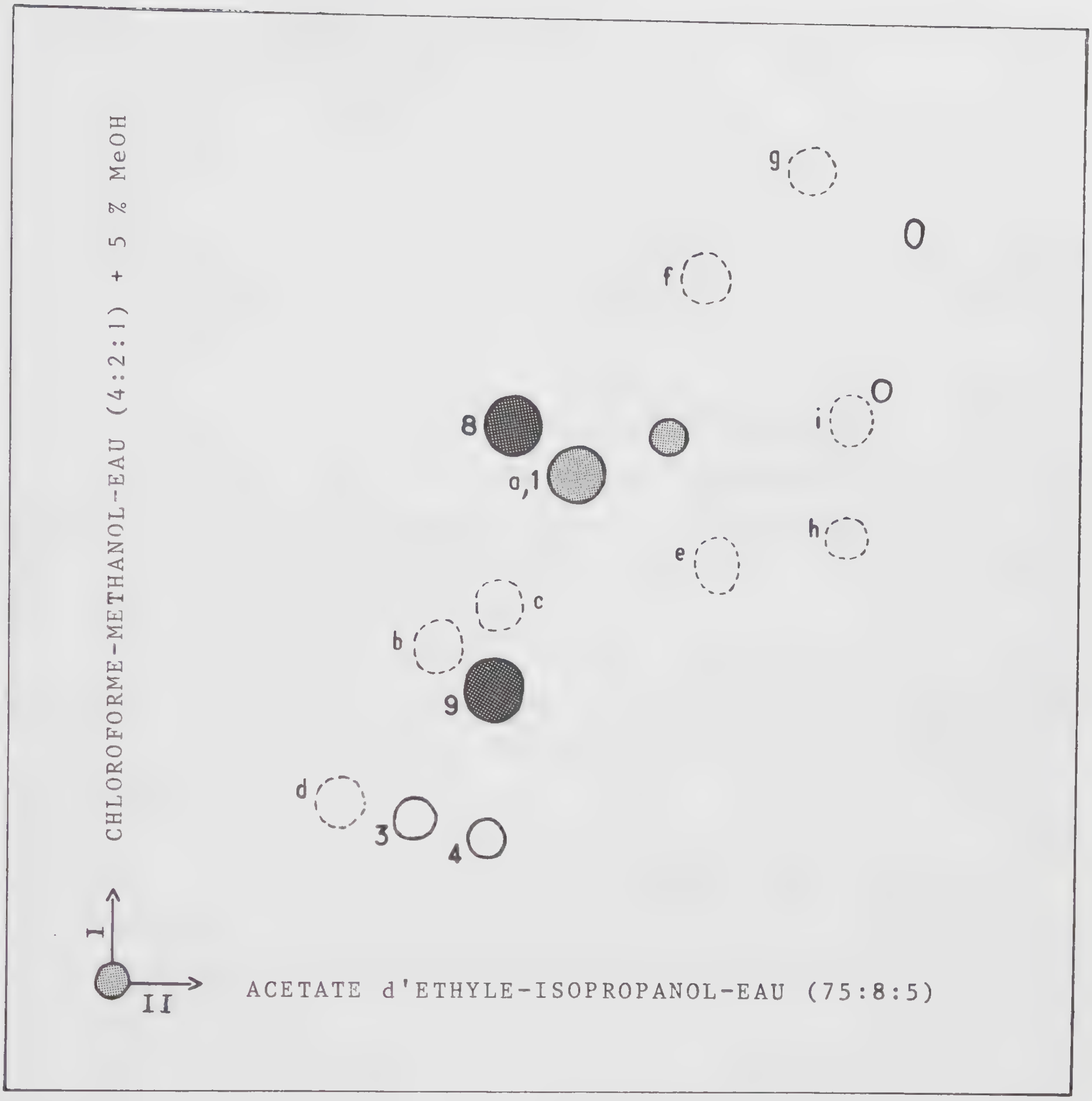


Fig. VII-1 : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE SILICE MN-N-HR DE L'HYDROLYSAT FORMIQUE DE LA CHAÎNE D'ADN IRRADIEE EN SOLUTION AQUEUSE DESAEREE.

1 = thymine ; 3 = dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis* ; 4 = dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *trans* ; 8 = dihydro-5,6 thymine ; 9 = hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine.

a = thymine ; b = thymidine ; c = uracile ; d = uridine ; e = fluoro-5 uracile ; f = acétyl-3' thymidine ; g = diacétyl-3'5' thymidine ; h = bromo-5 hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine ; i = méthylène-hydantoïne.

VII.2.1.1 - *Thymine* [1]

Une quantité importante de thymine non modifiée est éliminée de la chaîne d'ADN par hydrolyse acide. En effet, les pH acides favorisent la libération plus ou moins complète des bases constitutives de l'ADN.

La forte absorption UV de la thymine permet son identification immédiate sur les différents chromatogrammes (fig. VII-1). Les R_f sont connus (tableau I).

VII.2.1.2 - *Dihydro-5,6 thymine* [8]

La position chromatographique du radioproduit [8] dans les différents systèmes de solvants (tableau I) est en parfaite correspondance avec les R_f observés pour les dihydro-5,6 thymine de radiocoupure et de référence.

L'ouverture du cycle pyrimidique saturé, en milieu alcalin, conduit à la méthyl-2 propionylurée révélable au PDAB /49/, permettant ainsi une caractérisation sans équivoque de la dihydro-5,6 thymine (fig. IV-3 ; tableau I).

VII.2.1.3 - *Hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine* [9]

Le comportement chromatographique du composé [9] est à rapprocher de celui de l'hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine de référence obtenue par synthèse /115/ (tableau I).

L'action d'une solution basique sur la substance [9] permet sa caractérisation par obtention d'hydroxy-2 méthyl-2 propionylurée (fig. IV-4) révélable au PDAB /49/. Les R_f de l'uréide ont été donnés (tableau I).

VII.2.1.4 - *Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine cis et trans* [3,4]

Les produits [3] et [4] ont été détectés à l'emplacement caractéristique des glycols de thymine (tableau I).

Leur importance relative dans l'hydrolysat, par rapport aux autres substances radioformées, confirme qu'il s'agit là de composés mineurs résultant en partie d'une désaération initiale qui n'était pas totale.

VII.2.1.5 - Autres produits.

L'acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique [6] et l'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne [5] ont pu être détectés occasionnellement à l'état de traces dans les hydrolysats. Comme les glycols, ce ne sont que des radioproduits mineurs des conditions désaérées, résultant en partie d'une oxygénation résiduelle.

VII.2.2 - Produits secondaires.

Ils sont fort peu nombreux et importants (fig. VII-1), compte tenu de la grande stabilité des composés primaires correspondants.

Aucun d'entre eux n'a été identifié et aucune corrélation du type [5]-[12] n'a été établie.

VII.3 - PRODUITS LIBERES PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE : ETUDE QUALITATIVE

L'hydrolyse enzymatique de la chaîne d'ADN, préalablement soumise à l'action du rayonnement γ en conditions désaérées, conduit à la libération des radioproduits correspondants ainsi que de thymidine (fig. VII-2 et III-2) :

VII.3.1 - Thymine [1]

VII.3.2 - Dihydro-5,6 thymine [8]

VII.3.3 - Hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine [9]

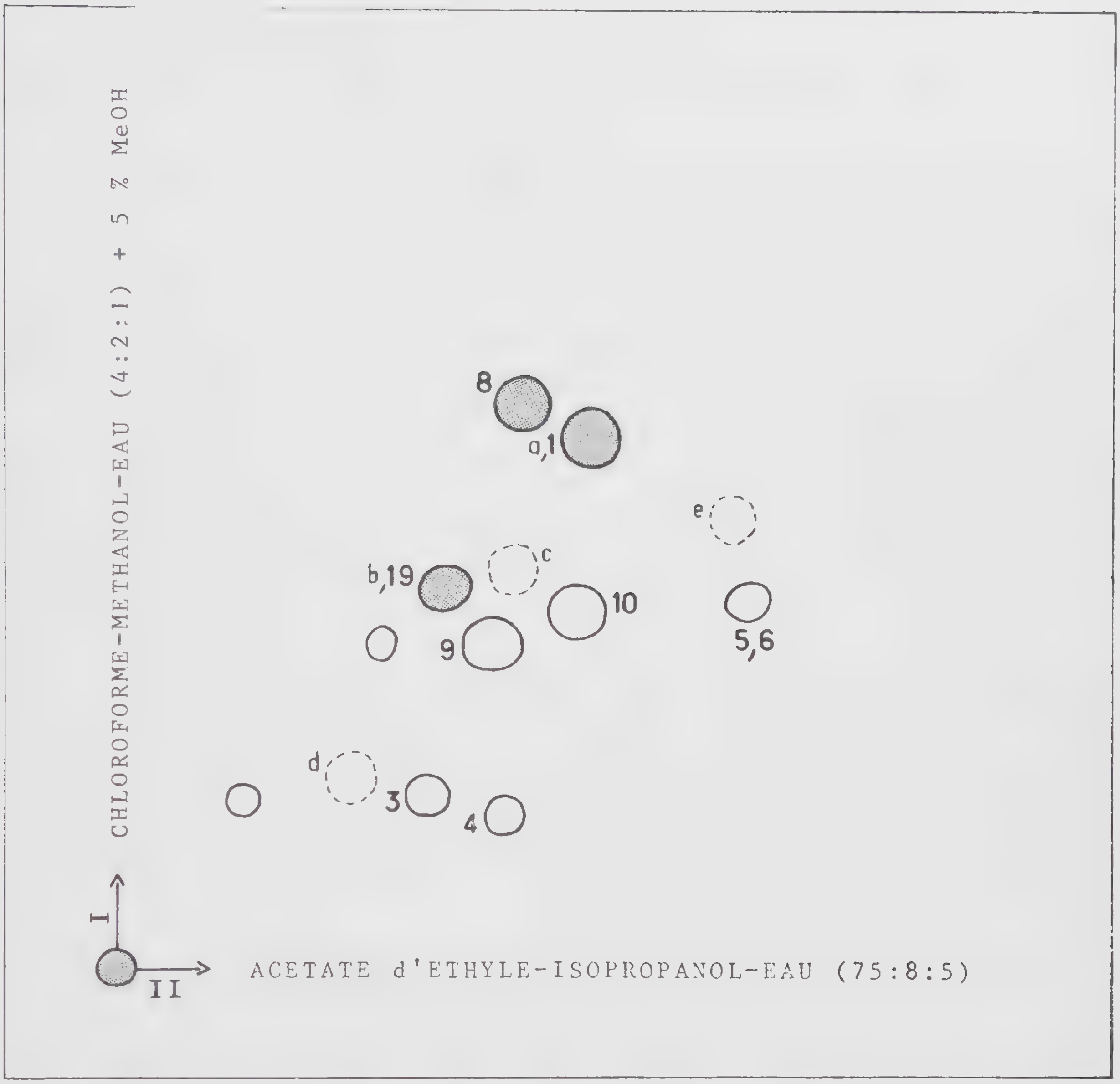


Fig. VII-2 : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE SILICE MN-N-HR DE L'HYDROLYSAT ENZYMATIQUE DE LA CHAÎNE D'ADN IRRADIEE EN SOLUTION AQUEUSE DESAEREE.

1 = thymine ; 3 = dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis* ; 4 = dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *trans* ; 5 = hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne ; 6 = acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique ; 8 = dihydro-5,6 thymine ; 9 = hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine ; 10 = hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine ; 19 = thymidine.

a = thymine ; b = thymidine ; c = uracile ; d = uridine ; e = fluoro-5 uracile.

VII.3.4 - Dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine *cis* et *trans* [3,4]

Ces substances ont été identifiées et caractérisées sans ambiguité par les microtests déjà utilisés pour ces produits.

VII.3.5 - Hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine [10]

L'intérêt de l'hydrolyse de la chaîne d'ADN par un extrait enzymatique d'*Escherichia coli* réside principalement dans la libération du radioproduit relativement peu stable qu'est l'hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine. C'est le seul type d'hydrolyse qui soit suffisamment doux pour ne pas entraîner une déshydratation de ce radioproduit en thymine, parallèlement à sa libération (fig. VII-3).

La position de cet hydrate de thymine dans les différents systèmes chromatographiques correspond à celle du produit inerte (tableau I).

Sa transformation en hydroperoxy-6 dihydro 5-6 thymine, en présence d'eau oxygénée /21,154/, permet une caractérisation positive après révélation colorée à l'iodure de potassium /149/ des formes *cis* et *trans* du peroxyde, en coïncidence avec les spots autoradiographiques. Le mécanisme de la réaction et les R_f des produits ont été donnés page 77 .

VII.3.6 - Thymidine [19]

La chromatographie des hydrolysats enzymatiques de la chaîne d'ADN fait apparaître une tache marquée à l'emplacement caractéristique de la thymidine (fig. VII-2). La forte absorption UV de ce nucléoside permet une caractérisation immédiate.

Il est bon de souligner que nous avons pu détecter de façon très occasionnelle la présence du dérivé nucléosidique de quelques uns des radioproduits cités précédemment (fig. VII-2). Ceci est normal puisque la libération de thymidine prouve que le broyat cellulaire contient la ou les enzymes (nucléotidases, phosphatases, ...) nécessaires à la libération du nucléoside libre.

La libération de thymidine étant déjà très faible, et le rapport thymidine/thymidine modifiée étant probablement du même ordre de grandeur que le rapport thymine/thymine modifiée, cela explique que les dérivés nucléosidiques des radioproduits soient libérés en quantité tellement faible que leur détection sur le chromatogramme n'ait pu avoir lieu que dans de très rares cas.

VII.4 - DISCUSSION.

VII.4.1 - Critique des méthodes.

La technique d'hydrolyse par l'acide formique appelle les mêmes remarques que celles émises au niveau de l'étude des radioproduits portés par la chaîne d'ADN irradiée en conditions aérées (Cf. VI.4.1).

Dans le cas des radioproduits des conditions désaérées, cette méthode est d'autant plus appropriée que ces substances sont, à une exception près, très stables et fort peu dégradées en dérivés secondaires.

Ceci facilitera la mise au point des conditions optimales d'hydrolyse quantitative qui demeure à effectuer. Les conditions -$HCOOH$ 26 N/90°C/8 h- ou -$HCOOH$ 26 N/60°C/16 h-semblent une base de départ correcte pour cette étude.

Une étude critique de la technique d'hydrolyse enzymatique par un broyat cellulaire d'*Escherichia coli* est indispensable.

Cette méthode semble permettre une étude plus fine des radiolésions : son intérêt dans la mise en évidence de l'hydrate de thymine sur la chaîne a été signalé.

Il faut toutefois être conscient de certains inconvénients auxquels il faudra s'efforcer de pallier à l'avenir.

Nous avons pu constater une très grande dépendance du rendement de l'hydrolyse avec la "fraicheur" du broyat cellulaire. Il est indispensable d'utiliser ce dernier dans les minutes qui suivent l'achèvement de sa préparation pour obtenir une efficacité maximum au cours de l'hydrolyse.

La technique classique de conservation des extraits enzymatiques dans l'azote liquide, souvent utilisée [50], s'avère dans le cas présent peu satisfaisante, car elle induit une inactivation rapide de l'extrait. Ainsi, nous avons pu constater, au cours de certaines hydrolyses, une efficacité considérablement diminuée par suite de l'utilisation d'un extrait cellulaire conservé seulement quelques heures au froid. Il faut toutefois souligner que le rendement qualitatif demeure par contre inchangé, ce qui impliquerait une inactivation uniforme de toutes les enzymes du broyat.

La détermination d'une durée minimum de stockage paraît nécessaire si aucune solution ne permet de pallier à cette inactivation à basse température.

Des essais ont été effectués, dans lesquels l'extrait enzymatique était obtenu à partir d'une suspension bactérienne préalablement irradiée à 40 000 Rads. Nous pensions ainsi augmenter l'efficacité de l'extrait, compte tenu de certaines hypothèses émises à l'heure actuelle selon lesquelles certaines enzymes de réparation, non fonctionnelles dans la cellule, seraient initiées par le rayonnement.

Nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les deux types de traitement, mais il ne s'est agi là que d'essais préliminaires. Des études plus systématiques sont encore à effectuer sur ce point avant de conclure sur l'amélioration ou non amélioration de l'hydrolyse par irradiation préalable des cellules à partir desquelles est constitué le broyat.

La composition du milieu d'incubation devra faire l'objet de recherches systématiques : l'apport de cofacteurs tels que l'ATP pourrait être positif.

L'influence du facteur temps et la reproductibilité de la méthode devront également être analysées avant que celle-ci ne trouve une forme définitive permettant, éventuellement, un dosage quantitatif des produits radioformés sur la chaîne irradiée en conditions désaérées.

Pour l'instant, cette technique nous paraît devoir être réservée à des études qualitatives, domaine dans lequel elle a prouvé ses avantages. Ainsi, l'application de cette méthode à la

chaîne d'ADN irradiée en conditions aérées pourrait permettre éventuellement de détecter une substance instable telle que la formyl-N pyruvyl-N' urée qui est dégradée en milieu acide.

VII.4.2 - *Discussion des résultats.*

Les principaux radioproduits stables des conditions désaérées ont été détectés dans les hydrolysats acides. L'analyse des hydrolysats enzymatiques a permis l'identification de ces mêmes substances stables ainsi que des hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine.

Les deux méthodes qui s'avèrent complémentaires sur le plan qualitatif, confirment donc les résultats obtenus au niveau de produits de coupure directe, et notamment la provenance effective de ces derniers de la chaîne polynucléotidique.

Un rapprochement de nos observations avec celles de HARIHARAN et CERUTTI /64/ peut être effective avec toutes les réserves évoquées par ailleurs. Les travaux de ces auteurs semblent indiquer que le méthyl-glycérol dosé résulte de la réduction des dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine et hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine éventuellement libérés par la bactérie dans le milieu d'incubation de post-irradiation.

Le type de résultats observé au niveau de l'hydrolyse enzymatique par un broyat cellulaire d'*Escherichia coli* nous incite à quelques réflexions : la présence de quelques enzymes nucléolitiques paraît nécessaire pour expliquer la présence des substances caractérisées.

Si l'action d'une endonucléase, type DNase, ou d'une exonucléase, type phosphodiestérase, paraît probable dans un premier temps, bien que non démontrée, l'intervention de nucléosidases pour rompre la liaison N-glycosidique et libérer la thymine et les thymines modifiées est indiscutable.

La présence de thymidine résulte probablement de l'intervention d'une phosphomonoestérase, type nucléotidase ou phosphatase, hydrolysant une liaison phosphomonoester, précédée de l'hydrolyse récurente de la chaîne par une exonucléase en vue de libérer les nucléotides monophosphates sur lesquels s'exercera l'action de la phosphomonoestérase.

Il serait utile de pouvoir déterminer si l'action hydrolytique des nucléosidases impliquées est influencée par les modifications portées par le cycle thymine (ce que nous ignorons à l'heure actuelle). Ceci est important dans l'optique de dosages éventuels des radioproduits par la méthode des broyats.

Les précédentes remarques émises, quant aux enzymes du broyat entrant en jeu pour libérer les radioproduits, nous incitent à penser qu'il pourraît être judicieux d'essayer des associations adéquates d'enzymes commerciales, et de comparer l'efficacité obtenue avec celle du broyat.

CONCLUSIONS GENERALES

L'action des radiations ionisantes sur les êtres vivants consiste essentiellement en diverses altérations du patrimoine génétique de la cellule.

Ces dégradations, qui résultent en partie de l'attaque des espèces radicalaires issues de la radiolyse de l'eau, présente en grande quantité dans la cellule, sont largement étudiées depuis quelques années et leur nature commence à être élucidée. Parmi ces altérations, une catégorie demeure encore très méconnue : les radiolésions des bases. Leur importance au point de vue des répercussions sur les anomalies biologiques (mutagénèse, cancérogénèse, tératogénèse ...) est reconnue;toutefois, la caractérisation et le dosage de ce type de défaut se heurtent à de nombreuses difficultés sur le plan expérimental (produits de radiolyse parfois instables et libérés en très faible quantité).

Une connaissance, maintenant solide, de la radiochimie de la base, du nucléoside et du nucléotide isolés nous a permis d'aborder la radiolyse in vitro du motif thymidyle incorporé dans la chaîne d'ADN, étape indsipensable avant d'aborder ce problème à un niveau de complexité supérieure : la radiolyse de l'ADN in vivo.

La radiolyse γ de l'ADN en solution aqueuse a été étudiée en conditions aérées et désaérées, tant au niveau des produits de coupure directe de la liaison glycosylamine qu'à celui des produits non éliminés de la chaîne au cours de l'irradiation.

En condition aérée, neuf produits de coupure ont été caractérisés : thymine ; dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine cis et trans ; pyruvamide ; formyl-N pyruvyl-N' urée ; hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne ; acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique ; acétylurée ; formylurée.

Seule la thymine avait été caractérisée sans ambigüité. La présence de composés du type hydroxy-6 (hydroperoxy-6) dihydro-5,6 thymine avait été soupçonnée par une méthode de dosage indirect qui n'est pas spécifique.

Parmi ces substances, nous avons pu retrouver dans l'hydrolysat de la chaîne polynucléotidique : thymine ; dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine cis et trans ; acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique ; hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne ; formylurée.

En conditions désaérées, neuf produits de coupure ont été identifiés : thymine ; dihydro-5,6 thymine ; hydroxy-5 dihydro-5,6 thymine ; hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine cis et trans ; acide hydroxy-5 méthyl-5 barbiturique ; hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne

Par deux techniques d'hydrolyse complémentaires, ces neuf substances ont été détectées sur la chaîne polynucléotidique.

Seuls l'hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine, les dihydroxy-5,6 dihydro-5,6 thymine ainsi que l'hydroxy-5 méthyl-5 hydantoïne avaient été envisagés comme susceptibles de se former d'après le dosage indirect précédemment cité.

La variation, en fonction de la dose appliquée, de l'importance relative de ces substances, en tant que produits de coupure, est donnée.

La présence, en quantité relativement importante, de nucléotides au niveau des composés de rupture directe a été notée, alors qu'aucune trace notable de nucléosides n'a pu être relevée. L'analyse de la nature de ces nucléotides et des lésions qu'ils portent reste à effectuer.

La technique de chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de silice, à l'aide des solvants I (chloroforme-méthanol-eau [4:2:1]) et II (acétate d'éthyle-isopropanol-eau [75:8:5]), a été un outil de choix pour la séparation des produits radioformés, tout particulièrement lorsqu'ils sont instables (pyruvamide, "hydrates"), en raison de l'excellente dispersion des taches obtenue et de la courte durée de développement.

Les microquantités de ces produits, rendant impossible leur détection par les techniques courantes de coloration ou d'absorption UV, nous ont contraint à l'emploi systématique de révélations autoradiographiques. Pour cela, la mise en oeuvre de techniques bactériologiques s'est avérée nécessaire : l'ADN, marqué sur la thymine, a été synthétisé par des bactéries cultivées dans un milieu contenant l'isotope radioactif.

Il a été impossible de confirmer la nature des substances de radiolyse par propriétés spectrales du fait qu'elles apparaissaient seulement à l'état de traces. Des microréactions de caractérisation, spécifiques de chaque produit, ont dû être mises au point.

Deux techniques d'hydrolyse douce, permettant une analyse des produits radioformés sur la chaîne, sont décrites et discutées. Elles ont permis l'identification, au niveau de l'hydrolysat, des principaux produits de coupure directe. Elles devraient aboutir à une mesure quantitative de ces diverses substances en fonction de la dose de rayonnement appliquée.

La technique d'hydrolyse acide semble intéressante pour la détermination quantitative des substances stables ; l'hydrolyse enzymatique paraît plus convenable pour des déterminations qualitatives, en particulier dans le cas de composés labiles.

L'examen des divers produits de radiolyse détectés conduit à une confirmation de l'hypothèse selon laquelle l'extrapolation à l'ADN des résultats obtenus au niveau de la base ou du nucléoside est hasardeuse, et ne peut être effectuée qu'avec réserves et précautions. Ainsi, la radiolyse du fragment thymidylique de l'ADN n'est pas calquée sur celle de la thymine : tous les dérivés de radiolyse de la thymine ne sont pas retrouvés au niveau de l'ADN, tant en conditions aérées que désaérées ; inversement, certains composés radioformés à partir de l'ADN n'ont pas leur équivalent au niveau thymine : c'est le cas du pyruvamide qui n'apparaît que dans la radiolyse de la thymidine.

En conclusion, ce travail apparaît comme une étape appréciable dans la mise au point du dosage spécifique du dommage que subissent in vivo les bases constitutives des acides nucléiques sous rayonnement.

- BIBLIOGRAPHIE -

/1/ ACHEY P. and DURYEA H.
Production of DNA strand breaks by the hydroxyl radical
Int. J. Radiat. Biol. 25, 6 (1974) 595-601

/2/ ACHEY P.M., DURYEA H.Z. and MICHAELS G.S.
Choice of solvent for studying the role of water in ionizing radiation action on DNA
Radiation Research 58 (1974) 83-90

/3/ BARRON E.S.G., JOHNSON P. et COBURE A.
Effect of X-irradiation on the absorption spectrum of purines and pyrimidines
Radiation Research 1 (1954) 410-425

/4/ BARSZCZ D. et SHUGAR D.
Radiation chemistry of nucleic acids and some derivatives
Acta Biochim. Polon. 8 (1961) 455-464

/5/ BARTKOWIAK J., KLYSZEJKO-STEFANOWICZ L., WIERZBICKI R. and ZABLOCKA E.
Selective extraction of histones from normal and irradiated calf lymph-nodes
Int. J. Radiat. Biol. 20, 2 (1971) 173-176

/6/ BAUDISCH O. et DAVIDSON D.
The mechanism of oxydation of thymine
J. Biol. Chem. 64 (1925) 233-239

/7/ BAYLEY C.R., BRAMMER K.W. and JONES A.S.
The nucleotide sequence in deoxyribonucleic acids
Part V. The alkaline degradation of apurinic acids
J. Chem. Soc. (1961) 1903-1907

/8/ BEN-HUR E. and BEN-ISHAI R.
DNA repair in ultraviolet light irradiated *HeLa* cells and its reversible inhibition by hydroxyurea
Photochem. Photobiol. 13 (1971) 337-345

/9/ BEUKERS R. et BERENDS W.
Isolation and identification of the irradiation product of thymine
Biochim. Biophys. Acta 41 (1960) 550-551

/10/ BEUKERS R., IJLSTRA J. and BERENDS W.
The effect of U.V. light on some components of the nucleic acids
V.Reversibility of "the first irreversible reaction" under special conditions
Recueil travaux chimiques Pays-Bas 78 (1959) 883-888

/11/ BLOCK J. and LOMAN H.
The effects of γ-radiation in DNA
Current Topics in Radiation Research Quaterly 9 (1973) 165-245

/12/ BLOK J. and VERHEY W.S.D.
The attack of free radicals on biologically active DNA in irradiated aqueous solutions
Radiation Research 34 (1968) 689-703

/13/ BOHNE L., COQUERELLE Th. and HAGEN U.
Radiation sensitivity of bacteriophage DNA
II.Breaks and cross-links after irradiation *in vivo*
Int. J. Radiat. Biol. 17, 3 (1970) 205-215

/14/ BOPP A. and HAGEN U.
End group determination in γ-irradiated DNA
Biochim. Biophys. Acta 209 (1970) 320-326

/15/ BOYCE R.P. and HOWARD-FLANDERS P.
Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in *E.coli* K12
Proc. Natl. Acad. Sc. USA 51 (1964) 293-300

/16/ CADET J.
Radiolyse gamme de la thymidine en solution aqueuse
Thèse de Doctorat d'Etat Grenoble n° A.O. 9033 (1973)

/17/ CADET J., DUCOLOMB R. et TEOULE R.
Radiolyse gamma de la thymidine-5' monophosphate en solution aqueuse aérée. Identification de la N(phospho-5 desoxy-2-β-D-*erythro*-pentofurannosyl) formamide
C.R. Acad. Sc. Paris 279 (1974) 549-551 *série C.*

/18/ CADET J. et TEOULE R.
Chromatographie sur couches minces des nucléosides
J. Chromatog. 76 (1973) 407-415

/19/ CADET J. and TEOULE R.
Radiation chemistry of nucleic acids : characterization of thymine hydroxy-hydroperoxides
Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 3 (1974) 1047-1052

/20/ CADET J. et TEOULE R.
Site d'attaque du radical hydroxyle sur le cycle pyrimidique.
Peroxydes de thymine et de thymidine
C.R. Acad. Sc. Paris 276 (1973) 1743-1746 - *Série C* -

/21/ CADET J. et TEOULE R.
Irradiation gamma de la thymine en milieu désaéré : isomères *Cis* et *Trans* de l'hydroxy-6 dihydro-5,6 thymine
Int. Journal of applied Radiation and Isotopes 22 (1971) 273-280

/22/ CADET J. et TEOULE R.
Peroxydes formés par action du rayonnement γ sur la thymine en solution aqueuse aérée
Biochim. Biophys. Acta 238 (1971) 8-26

/23/ CADET J. et TEOULE R.
Irradiation gamma de la thymidine en solution aqueuse aérée
Tetrahedron Letters 31 (1972) 3225-3228

/24/ CAPERSSON T., KLEIN T.E. et RINGERTZ N.R.
Cancer Res. 18 (1958) p. 857

/25/ CARRIER W.L., RAHN R.O., LANDRY L.C. and HELENE C.
Sensitized photodimerization and chain breaks in DNA
Biophys. J. 11 *(1971) p. 26 a*

/26/ CERUTTI P.A., MILLER N., PLEISS M.G., REMSEN J.F. and RAMSAY W.J.
Photohydration of uridine in the RNA of coliphage
R 17, I. Reductive assay for uridine photohydration
Proc. Natl. Acad. Sc. USA 64 *(1969) 731-738*

/27/ CHARGAFF E. and DAVIDSON J.N.
The nucleic acids (Chemistry and Biology)
Academic press inc., publishers - New-York, N.Y. (1955) 191-205

/28/ CHARLIER M., HELENE C. and CARRIER W.L.
Photochemical reactions of aromatic ketones with nucleic acids and their components.
III.Chain breakage and thymine dimerization in benzophenone photosensitized DNA
Photochem. and photobiol. 15 *(1972) 527-536*

/29/ CLEAVER J.E.
Defective repair replication of DNA in *Xeroderma pigmentosum*
Nature 218 *(1968) 652-656*

/30/ CLEAVER J.E.
Xeroderma pigmentosum : a human disease in which an initial stage of DNA repair is defective
Proc. Natl. Acad. Sc. USA 63 *(1969) 428-435*

/31/ CLEAVER J.E. and TROSKO J.E.
Absence of excision of ultraviolet-induced cyclobutane dimers in *Xeroderma pigmentosum*
Photochem. and Photobiol. 11 *(1970) 547-550*

/32/ COLLYNS B., OKADA S., SCHOLES G., WEISS J.J. and WHEELER C.M.
Chain scission and hydrogen bond breakage on irradiation of DNA
Radiation Research 25 *(1965) 526-536*

/33 a/ COQUERELLE T., BOHNE L. and HAGEN U.
Radiation sensitivity of bacteriophage DNA
I. Breaks and crosslinks after irradiation *in vitro*
Zeitschrift für Naturforschung 24 b*, 7 (1969) 885-893*

/33 b/ COQUERELLE T., BOPP A., KESSLER B. and HAGEN U.
Strand breaks and 5' end-groups in DNA of irradiated thymocites
Int. J. Radiat. Biol. 24*, 4 (1973) 397-404*

/34/ CORRY P.M. and COLE A.
Double strand rejoining in mammalian DNA
Nature new Biology 245 *(1973) 100-101*

/35/ CRAMP W.A., WATKINS D.K. et COLLINS J.
Effects of ionizing radiation on bacterial DNA membrane complexes
Nature New Biol. 235 *(1972) 76-77*

/36/ DALRYMPLE G.V., SANDERS J.L., MOSS A.J., BAKER M.L., NASH J.C. and WILKINSON K.P.
Radiation alters the ability of mammalian cell DNA to complete in a DNA : DNA hybridization system
Biochem. and Biophys. Res. Commun. 47, 4 (1972) 938-943

/37/ DALRYMPLE G.V., SANDERS J.L., MOSS Jr A.J., BAKER M.L. and WILKINSON K.P.
Radiation produces breaks in L cell and mouse liver DNA characterized by 5' phosphoryl termini
Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 2 (1969) 300-305

/38/ DANIELS M., SCHOLES G., WEISS J. and WHEELER C.M.
Chemical action of ionizing radiations in solution.
Part XVII. Degradation of deoxyribonucleic acid in aqueous solution by irradiation with X-rays (200 KV)
J. Chem. Soc. (1957) 226-234

/39/ DEBOER G., KLINGHOFFER O. and JOHNS H.E.
Reversal mechanisms for the photohydrates of cytosine and its derivatives
Biochim. Biophys. Acta 213 (1970) 253-268

/40/ DESCOURS S. and RASSAT A.
Etude par RPE des radicaux libres créés sous irradiation dans certaines substances organiques. Applications en dosimétrie de la mesure des radicaux libres créés dans l'alanine
Rapport C.E.A. R 3913 (1970)

/41/ DOUMAS B. et BIGGS H.G.
The nonenzymatic decomposition of 5-methylbarbituric acid
J. Biol. Chem. 237 (1962) 2306-2309

/42/ DUCOLOMB R.
Effet des rayons gamma sur l'uracile et l'acide uridylique en solution aqueuse aérée
Thèse de Doctorat 3e cycle Grenoble n° 72109 (1972)

/43/ DUCOLOMB R., CADET J. et TEOULE R.
Irradiation γ de l'acide uridylique - rupture de la liaison N-glycosidique
Int. J. Radiat. Biol. 25, 2 (1974) 139-149

/44/ EKERT B. et MONIER R.
Structure of thymine hydroperoxide produced by X-irradiation
Nature 184 (1959) BA 58-59

/45/ EKERT B. et PATTEIN A.
Effets des rayons gamma sur les ribosomes d'*E.coli*
Int. J. Radiat. Biol. 17, 1 (1970) 47-59

/46/ EKERT B. et TISNE M.R.
Effets des rayons γ sur les acides polyriboadenylique, polyribouridylique et leurs associations bi-et trifilaires
Biochim. Biophys. Acta 114 (1966) 481-490

/47/ EL-METAINY A., SHIGEMITSU TANQ, KEIJY YANO and HIKOYUKI YAMAGUCHI
Chemical nature of radiation-induced single-strand breaks in the DNA of dormant barley seeds *in vivo*
Radiation Research 55 (1973) 324-333

/48/ FAHR E.
Chemical investigations of the molecular origin of biological radiation damage
Angew. Chem. Int. Edit. 8, 8 (1969) 578-593

/49/ FINK R.M., CLINE R.E., Mc GAUGHEY C. and FINK K.
Chromatography of pyrimidine reduction products
Anal. Chem. 28 (1956) 1-4

/50/ FOUQUE B.
Dérivés de la dihydro-5,6 thymidine. Action inhibitrice sur la thymidine kinase des cellules d'ascites d'Ehrlich
Thèse de Doctorat 3e cycle Grenoble n° 73166 (1973)

/51/ FRAMPTON E.W. and BILLEN D.
X-ray-induced degradation of deoxyribonucleic acid in a polyauxotrophic bacterium
Radiation Research 28 (1966) 109-120

/52/ FREESE E. and FREESE E.B.
Mutagenic and inactiving DNA alterations
Radiation Research Suppl.6 (1966) 97-140

/53/ FREIFELDER D.
Lethal changes in bacteriophage DNA produced by X-rays
Radiation Research Suppl.6 (1966) 80-96

/54/ FREIFELDER D.
Matching of single-strand breaks to form double-strand breaks in DNA
Biopolymers 7 (1969) 681-693

/55/ FREY R. and HAGEN U.
Oxygen effect on γ-irradiated DNA
Rad. and Environm. Biophys. 11 (1974) 125-133

/56/ FRICKE H.
Am. J. Roentgenol. 18 (1927) 430

/57/ GANESAN A.K.
Persistence of pyrimidine dimers during post-replication repair in ultraviolet light-irradiated *Escherichia Coli K12*
J. Mol. Biol. 87 (1974) 103-119

/58 a/ GAZIEV A.I., SERGEEVA S.A. and ZAKREVSKAJA D.T.
Chemical nature of the ends of DNA single-strand breaks produced by ionizing γ-radiation *in vivo* and pathways of their reparation
Studia biophysica 42, 3 (1974) 203-218

/58 b/ Mc GRATH R.A. and WILLIAMS R.W.
Reconstruction *in vivo* of irradiated *Escherichia Coli* deoxyribonucleic acid ; the rejoining of broken pieces
Nature 212 (1966) 534-535

/59/ GROSSMAN L.
The effects of ultraviolet-irradiated polyuridylic acid in cell-free protein synthesis in *E.coli*
Proc. Natl. Acad. Sc. USA 48 (1962) 1609-1614

/60/ HAGEN U.
Bestimmung von einzel-und doppel brüchen in bestrahlter desoxyribonukleinsäure durch die molekularge wichtsverteilung
Biochim. Biophys. Acta 134 (1967) 45-58

/61/ HANAWALT P.C.
Repair replication of damaged DNA *in vivo* in :
"Genetic concepts and neoplasia" 23th annual symposium on fundamental cancer research (1969)
(The Williams and Wilkins Co) BALTIMORE (1970) p.528

/62/ HANAWALT P.C.
Repair of genetic material in living cells
Endeavour 31, 113 (1972) 83-87

/63/ HARIHARAN P.V. et CERUTTI P.A.
Repair of γ-Ray induced thymine damage in *Micrococcus radiodurans*
Nature New Biology 229 (1971) 247-249

/64/ HARIHARAN P.V. et CERUTTI P.A.
Formation and repair of γ-ray induced thymine damage in *Micrococcus radiodurans*
J. Mol. Biology 66 (1972) 65-81

/65/ HART R.W. and SETLOW R.B.
Correlation between deoxyribonucleic acid excision- repair and life-span in a number of mammalian species
Proc. Nat. Acad. Sc. USA 71, 6 (1974) 2169-2173

/66/ HARTMANN V., SONNTAG C.V. et SCHULTE-FROHLINDE
γ radiolyse von 2-desoxy-D-ribose in wäbriger lösung
Z. Naturforschg. 25b (1970) 1394-1404

/67/ HAYNES R.H.
The interpenetration of microbial inactivation and recovery phenomena
Radiation Research suppl. 6 (1966) 1-29

/68/ HAYON E.
Primary radicals yields in the radiation chemistry water and aqueous solutions
Radiation Chemistry of aqueous systems.
Ed. G. STEIN Interscience (1968) 157-209

/69/ HELENE C.
Photochemistry of nucleic acids
Photochem. and Photobiol. 18 (1973) 534-537 (year end Reviews)

/70/ HEMS G.
Chemical effects of ionizing radiation on deoxyribonucleic acid in dilute aqueous solution
Nature 186 (1960) 710-712

/71/ HERBERT M.A., LeBLANC J.C., WEINBLUM D. and JOHNS H.E.
Properties of thymine dimers
Photochem. and photobiol. 9 (1969) 33-43

/72/ HOLLAENDER A., GREENSTEIN J.P. and JENRIETTE W.V.
J. Nat. Cancer Inst. 2 (1941) p. 23

/73/ HORGAN V.J.
Differences in the oxygen-enhancement ratio for double-strand breaks in irradiated DNA according to the method of analysis
Int. J. Radiat. Biol. 25 (1974) 6 619-626

/74/ HOTZ G.
Infectious DNA from coliphage T 1
IV. The action of radicals induced by ^{60}Co-gamma rays in the wet state
Int. J. Radiat. Biol. 24, 1 (1973) 1-13

/75/ HOWARD-FLANDERS P. and BOYCE R.P.
DNA repair and genetic recombination : studies on mutants of *Escherichia coli* defective in these processes
Radiation Research Suppl. 6 (1966) 156-184

/76/ HUTTERMANN J. and MULLER A.
Free radicals in gamma-irradiated 2-deoxy-D-ribose : electron spin resonance of single crystals and polycrystalline material
Radiation Research 38 (1969) 248-259

/77/ JACOBS A., BOPP A. and HAGEN U.
In vitro repair of single-strand breaks in γ-irradiated DNA by polynucleotide ligase
Int. J. Radiat. Biol. 22, 5 (1972) 431-435

/78/ JENNINGS B.H., PASTRA S.C. and WELLINGTON J.L.
Photosensitized dimerization of thymine
Photochem. and Photobiol. 11 (1970) 215-226

/79/ JOHANSEN I., GULBRANDSEN R. and PETTERSEN R.
Effectiveness of oxygen in promoting X-ray-induced single-strand breaks in circular phage λ DNA and killing of radiation-sensitive mutants of *Escherichia Coli*
Radiation Research 58 (1974) 384-397

/80/ JOHANSEN I. and HOWARD-FLANDERS P.
Macromolecular repair and free radical scavenging in the protection of bacteria against X-rays
Radiation Research 24 (1965) 184-200

/81/ KAMAL A., Dr. GARRISON W.M.
Radiolytic degradation of aqueous cytosine : enhancement by a second organic solute
Nature 206 (1965) 1315-1317

/82/ KANAZIR D.T.
Radiation induced alterations in the structure of deoxyribonucleic acid and their biological consequences
"Progress in nucleic acid research and molecular biology" (Davidson J.N. et COHN W.E. Ed.) Academic Press NEW YORK 9 (1969) 117-222

/83/ KAPP D.S. and SMITH C.K.
Lack of *in vitro* repair of X-ray-induced chain breaks in DNA by the polynucleotide-joining enzyme
Int. J. Radiat. Biol. 14, 6 (1969) 567-571

/84/ KAPP D.S. and SMITH C.K.
Repair of radiation-induced damage in *Escherichia coli*
II Effect of *rec* and *uvr* mutations on radiosensitivity, and repair of X-ray-induced single-strand breaks in deoxyribonucleic acid
Journal of Bacteriology 103, 1 (1970) 49-54

/85/ KELNER A.
Effect of visible light on the recovery of *Streptomyces griseus conidia* from ultraviolet irradiation injury
Proc. Natl. Acad. Sc. USA 35 (1949) 73-79

/86/ KESSLER B., BOPP A. and HAGEN U.
Radiation-induced single-strand breaks in double-stranded circular DNA
Int. J. Radiat. Biol. 20, 1 (1971) 75-78

/87/ KITAYAMA S. and MATSUYAMA A.
Mechanism for radiation lethality in *Micrococcus radiodurans*
Int. J. Radiat. Biol. 19, 1 (1971) 13-19

/88/ KORNER I. and MALZ W.
Single strand interruptions in newly synthesized DNA in chinese hamster cells after X-irradiation
Studia Biophysica 41, 1 (1973) 11-20

/89/ KRUSHINSKAYA N.P. and SHAL'NOV M.I.
Nature of breaks in the DNA chain upon irradiation of aqueous solutions
Radiobiologya 7 (1967) 36-44

/90/ KUSHNER S.R., KAPLAN J.C., ONO H. and GROSSMAN L.
Enzymatic repair of deoxyribonucleic acid
IV. Mechanism of photoproduct excision
Biochemistry 10, 18 (1971) 3325-3334

/91/ LATARJET R.
Interaction of radiation energy with nucleic acids
Current topics in radiation Research Quaterly 8 (1972) 1-38

/92/ LATARJET R., EKERT B., APELGOT S. et REBEYROTTE N.
Etudes radiobiochimiques sur l'ADN
J. Chim. Phys. 58 (1961) 1046-1055

/93/ LATARJET R., EKERT B. and DEMERSEMAN P.
Peroxidation of nucleic acids by radiation : biological implications
Radiation Research Suppl. 3 (1963) 247-256

/94/ LEFORT M.
Action chimique des radiations.Effet indirect sur les systèmes biologiques
Radiobiologie Appliquée -Ed. Gauthier Villars 1 (1966) p. 263

/95/ LEHMANN A.R.
Postreplication repair of DNA in ultraviolet-irradiated mammalian cells
J. Mol. Biol. 66 (1972) 319-337

/96/ LEHMANN A.R. and ORMEROD M.G.
Double-strand breaks in the DNA of a mammalian cell after X-irradiation
Biochim. Biophys. Acta 217 (1970) 268-277

/97/ LEHNERT S. and MOROSON H.
X-ray-induced single-strand breaks in DNA of *E.coli B/r* : effect of irradiation and postirradiation conditions
Radiation Research 45 (1971) 299-310

/98/ LENNARTZ M., COQUERELLE T. and HAGEN U.
Effect of oxygen on DNA strand breaks in irradiated thymocytes
Int. J. Radiat. Biol. 24, 6 (1973) 621-625

/99/ LETT J.T. and ALEXANDER P.
Crosslinking and degradation of deoxyribonucleic acid gels with varying water contents when irradiated with electrons
Radiation Research 15 (1961) 159-173

/100/ LETT J.T., CALDWELL I., DEAN C.J. and ALEXANDER P.
Rejoining of X-ray-induced breaks in the DNA of leukaemia cells
Nature 214 (1967) 790-792

/101/ LETT J.T., STACEY K.A. and ALEXANDER P.
Crosslinking of dry deoxyribonucleic acids by electrons
Radiation Research 14 (1961) 349-362

/102/ LION Y. and VAN DE VORST A.
On the mechanism of formation of free radicals induced in nucleic acid bases by ionozing radiation
Int. J. Radiat. Phys. Chem. 3 (1971) 513-520

/103/ LOHMAN P.H.N.
Induction and rejoining of breaks in the deoxyribonucleic acid of human cells irradiated at various phases of the cell cycle
Mutation Research 6 (1968) 449-458

/104/ LOHMAN P.H.M. and BOOTSMA D.
(Short communication) Repair mechanisms in mammalian cells
Mutation Research 23 (1974) 147-150

/105/ LUCKE-HUHLE C., SEITER A. and JUNG H.
Contribution of strand breakage to inactivation of γ-irradiated dry *ΦX174*-DNA
Z. Naturforsch. 29 c (1974) 98-99

/106/ MARMUR J.
A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms
J. Mol. Biol. 3 (1961) 208-218

/107/ MATTERN M.R., HARIHARAN P.V., DUNLAP B.E. and CERUTTI P.A.
DNA degradation and excision Repair in γ-irradiated chinese hamster ovary cells
Nature New Biology 245 (1973) 230-232

/108/ MATSUDAIRA H. and FURUNO I.
The rejoining of X-ray-induced DNA strand breaks in nuclei isolated from Ehrlich ascites tumor cells
Biochim. Biophys. Acta 272 (1972) 202-211

/109/ MEHLITZ A., GIERSCHNER K. et MINAS Th.
Dünnschichtchromatographische tremnung von 2,4-dinitro phenylhydrazonen
Chemiker Ztg. 87 (1963) 573-576

/110/ MEISTRICH M.L.
Contribution of thymine dimers to the ultraviolet light inactivation of mutants of bacteriophage T4
J. Mol. Biol. 66 (1972) 97-106

/111/ MILETIC B., KUCAN Z. and NOVAK D.J.
Effect of repeated X-irradiation on the process of degradation of deoxyribonucleic acid
Nature 202 (1964) 106-107

/112/ MURAHASHI S., KOSAI K.Y. and DOURA F.
Methylene hydantoin and related compound
Bull. Chem. Soc. Jap. 39 (1966) 1559-1562

/113/ NEARY G.J., HORGAN V.J., BANCE D.A. and STRETCH A.
Further data on DNA strand breakage by various radiation qualities
Int. J. Radiat. Biol. 22, 6 (1972) 525-537

/114/ NOAMAN M., HAMDY M.K. et CASTER W.O
Effect of whole-body gamma irradiation on lysosomal enzymes in rat tissues
Bull. Georgia Acad. Sc. 26, 1 (1968) p.10

/115/ NOFFRE C., CIER A., CHAPURLAT R. et MARESHI J.P.
Hydroxy-5 dihydrouracile et hydroxy-5 dihydrothymine
Bull. Soc. Chim. (1965) 332-335

/116/ NOFFRE C. et OGIER M.H.
Preparation et propriétés de l'hydroxy-6 dihydrothymine
C. R. Acad. Sc. Paris, t 263 (1966) 1401-1403

/117/ ONO T. and OKADA S.
Estimation *in vivo* of DNA strand breaks and their rejoining in thymus and liver of mouse
Int. J. Radiat. Biol. 25, 3 (1974) 291-301

/118/ ORMEROD M.G.
Free-radical formation in irradiated deoxyribonucleic acid
Int. J. Radiat. Biol. 9, 3 (1965) 291-300

/119/ PALCIC B. and SKARSGARD L.D.
The effect of oxygen on DNA single strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells
Int. J. Radiat. Biol. 21, 5 (1972) 417-433

/120/ PATTERSON M.C., LOHMAN P.H.M., WEERD-KASTELEIN E.A. and WESTERWELD A.
Photoreactivation and excision repair of ultraviolet radiation-injured DNA in primary embryonic chick cells
Biophysical Journal 14 (1974) 454-466

/121/ PATTERSON M.C. and SETLOW R.B.
Endonucleolytic activity from *Micrococcus Luteus* that acts on γ-ray-induced damage in plasmid DNA of *Escherichia Coli* minicells
Proc. Nat. Acad. Sc. USA 69, 10 (1972) 2927-2931

/122/ PETTIJOHN D. and HANAWALT P.
Evidence for repair-replication of ultraviolet damaged DNA in bacteria
J. Mol. Biol. 9 (1964) 395-410

/123/ POLVERELLI M. and TEOULE R.
Gamma irradiation of cytosine in an aerated aqueous solution
I. Identification of radiolysis products of cytosine resulting from the deamination patway
Z. Naturforsch 29 c (1974) 12-15

/124/ RAHN R.O. and HOSSZU J.L.
Photochemical studies of thymine in ice
Photochem. Photobiol. 10 (1969) 131-137

/125/ REGAN J.D., TROSKO J.E. and CARRIER W.L.
Evidence for excision of ultraviolet-induced pyrimidine dimers from the DNA of human cells *in vitro*
Biophysical Journal 8 (1968) 319-325

/126/ RHAESE H.J. and FREESE E.
Chemical analysis of DNA alterations
I. Base liberation and backbone breakage of DNA and digodeoxyadenylic acid induced by hydrogen peroxide and hydroxylamine
Biochim. Biophys. Acta 155 (1968) 476-490

/127/ RONKAINEN P.
Chromatographic identification of carbonyl compounds
VI. Thin layer chromatographie resolution of mixtures of keto acid 2-4 dinitrophenylhydrazones
J. of Chromatography 28 (1967) 263-264

/128/ ROTI ROTI J.L. and CERUTTI P.A.
Gamma-ray induced thymine damage in mammalian cells
Int. J. Radiat. Biol. 25, 4 (1974) 413-417

/129/ ROTI ROTI J.L., STEIN G.S. and CERUTTI P.A.
Reactivity of thymine to γ-rays in *HeLa* chromatin and nucleoprotein preparations
Biochemistry 13, 9 (1974) 1900-1905

/130/ RUPP W.D. and HOWARD-FLANDERS P.
Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of *Escherichia Coli* following ultraviolet irradiation
J. Mol. Biol. 31 (1968) 291-304

/131/ RUPP W.D., WILDE C.E., RENO D.L. and HOWARD-FLANDERS P.
Exchanges between DNA strands in ultraviolet-irradiated *Escherichia Coli*
J. Mol. Biol. 61 (1971) 25-44

/132/ SAFFHILL R.
The incorporation of wrong bases by DNA polymerase I following γ-irradiation of DNA-like templates
Biochim. Biophys. Acta 349 (1974) 23-31

/133/ SCHOLES G.
Primary events in the radiolysis of nucleic acids and their components
Israel Journal of Chemistry 10 (1972) 1107-1122

/134/ SCHOLES G., WARD J.F. and WEISS J.
Mechanism of the radiation-induced degradation of nucleic acids
J. Mol. Biol. 2 (1960) 379-391

/135/ SCHOLES G., WEISS J. and WHEELER C.M.
Formation of hydroperoxydes from nucleic acids by irradiation with X-rays in aqueous systems
Nature 178, 4525 (1956) p. 157

/136/ SCHOTT H.N. and SHETLAR M.D.
Photochemical addition of amino acids to thymine
Biochem. and Biophys. Res. Comm. 59, 3 (1974) p. 1112

/137/ SCHWEIBERT M.C. and DANIELS M.
^{60}Co γ-ray induced peroxidation of DNA in aqueous solution
Int. J. Radiat. Phys. Chem. 3 (1971) 353-366

/138/ SELIGSON D. and SELIGSON H.
The conversion of alloxan to alloxanic acid in plasma
J. Biol. Chem. 190 (1950) 647-657

/139/ SETLOW J.K.
Photoreactivation
Radiation Research Suppl. 6 (1966) 141-155

/140/ SETLOW J.K.
Photo repair of biological systems
Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry 3, 1, 335-355

/141/ SETLOW R.B. and CARRIER W.L.
The disappearance of thymine dimers from DNA :an error-correcting mechanism
Proc. Natl. Acad. Sc. USA 51 (1964) 226-231

/142/ SETLOW R.B. and SETLOW J.K.
Evidence that ultraviolet-induced thymine dimers in DNA cause biological damage
Proc. Natl. Acad. Sc. USA 48 (1962) 1250-1257

/143/ SHUGAR D. PH. D.
The photochemistry of nucleic acids and its genetic implications
Israel Journal Med. Sc. 1, 6 (1965) 1347-1362

/144/ SIMON M.
Instabilité en milieu alcalin des oligodesoxynucleotides radio-induits
Int. J. Radiat. Biol. 16, 2 (1969) 167-182

/145/ SINSHEIMER R.L.
The photochemistry of uridylic acid
Radiation Research 1 (1954) p. 505

/146/ SMALL G.D., TAO M. and GORDON M.P.
Pyrimidine hydrates and dimers in ultraviolet-irradiated tobacco mosaic virus ribonucleic acid
J. Mol. Biol. 38 (1968) 75-87

/147/ SMITH K.C.
Physical and chemical changes induced in nucleic acids by ultraviolet light
Radiation Research Suppl. 6 (1966) 54-79

/148/ SMITH K.C., HODGKINS B. and O'LEARY M.E.
The biological importance of ultraviolet light induced DNA-protein crosslinks in *Escherichia Coli* 15 TAU
Biochim. Biophys. Acta 114 (1966) 1-15

/149/ STAHL E.
Thin layer chromatography
II. Standardization, detection, documentation and application
Chemiker Ztg. 82 (1958) 323-329

/150/ STELTER L., VON SONNTAG C. and SCHULTE-FROHLINDE D.
Radiation chemistry of DNA-model compounds
V. Phosphate climination from ribose-5-phosphate after OH radical attack at C-4
Int. J. Radiat. Biol. 25, 5 (1974) 515-519

/151/ STUY J.H.
Studies on the radiation inactivation of micro organisms
VI. X-ray-induced breakdown of deoxyribonucleic acid in *Haemophilus influenzae* and in other bacteria
J. of Bacteriology 79 (1960) 707-715

/152/ SWINEHART J.L., LIN W.S. and CERUTTI P.A.
Gamma-ray induced damage in thymine in mononucleotide mixtures, and in single-and double-stranded DNA
Radiation Research 58 (1974) 166-175

/153/ TAYLOR W.D. and GINOSA W.
Correlation of γ-ray inactivation and strand scission in the replicative form of *ΦX174* bacteriophage DNA
Proc. Natl. Acad. Sc. USA 58 (1967) 1753-1757

/154/ TEOULE R.
Radiolyse de la thymine en solution aqueuse
Thèse de Doctorat d'Etat Lyon (1970) n° 667

/155/ TEOULE R., BONICEL A., BERT C., CADET J. and POLVERELLI M.
Identification of radioproducts resulting from the breakage of thymine moiety by gamma irradiation of *E.coli* DNA in an aerated aqueous solution
Radiation Research 57 (1974) 46-58

/156/ TEOULE R., BONICEL A., BERT C., CADET J., POLVERELLI M. et FOUQUE B.
Radiochimie des acides nucléiques
II. Hydrolyse acide et enzymatique du fragment thymine modifié et lié à la chaîne polynucléotidique après irradiation gamma *in vitro* de l'ADN de *E.coli*
C.R.Acad. Sc. PARIS 279 (1974) 1797-1799 *série D.*

/157/ TEOULE R., BONICEL A. et BERT C.
Identification des radioproduits résultant de la coupure du fragment thymine par irradiation γ de l'ADN de *E.coli* en solution aqueuse désaérée
En préparation

/158/ TEOULE R., BONICEL A. et BERT C.
Radiochimie des acides nucléiques. Irradiation γ de l'ADN en solution aqueuse aérée.
Communication à la Société Chimique de France MARSEILLE 23-25 mai 1973. Actualité chimique n° 2, n° 64

/159/ TEOULE R. and CADET J.
Radiolysis of thymine in aerated aqueous solution
Chemical communications 20 *(1971) 1269-1270*

/160/ TEOULE R. et CADET J.
Effet des rayons γ sur les pyrimidines. Isolement et identification d'une nouvelle substance obtenue par radiolyse de la thymine = la méthyl-5 hydroxy-5 hydantoïne
C.R. Acad. Sc. Paris 268 t *(1969) 2501-2503 Série D*

/161/ TEOULE R. et CADET J.
Chromatographie des produits de radiolyse de la thymine
J. Chromatog. 43 *(1969) 368-375*

/162/ TEOULE R., CADET J. and ULRICH J.
Radiolyse de la thymine en solution aqueuse aérée
Caractérisation de la pyruvyl-N formyl-N' urée
C.R. Acad. Sc. Paris 270 t-*(1970) 362-364 Série C*

/163/ TRGOVCEVIC Z. and KUCAN Z.
Is DNA polymerase involved in DNA degradation following ionizing radiation?
Nature 226 *(1970) 752-753*

/164/ TRGOVCEVIC Z. and KUCAN Z.
Correlation between the breakdown of deoxyribonucleic acid and radiosensitivity of *Escherichia Coli*
Radiation Research 37 *(1969) 478-492*

/165/ ULIANA R., CREAC'H et DUCASTAING A.
Quelques aspects de la radiodénaturation de l'acide désoxyribonucléique (ADN)
Biochimie 53 *(1971) 461-468*

/166/ ULLRICH M. and HAGEN U.
Base liberation and concomitant reactions in irradiated DNA solutions
Int. J. Radiat. Biol. 19, *6 (1971) 507-517*

/167/ VAN DE VORST A., LION Y. and CALBERG-BACQ C.M.
Free radicals in the sugar moiety of X-irradiated DNA
Int. J. Rad. Biol. 24, *6 (1973) 605-608*

/168/ VAN DER SCHANS G.P., BLEICHRODT J.F. and BLOK J.
Contribution of various types of damage to inactivation of a biologically active double-stranded circular DNA by gamma-radiation
Int. J. Radiat. Biol. 23, *2 (1973) 133-150*

/169/ VAN DER SCHANS G.P. and BLOK J.
The influence of oxygen and suphhydryl compounds on the production of breaks in bacteriophage DNA by gamma-rays
Int. J. Radiat. Biol. 17, *1 (1970) 25-38*

/170/ VARGHESE A.J.
5-thyminyl-5,6-dihydrothymine from DNA irradiated with ultraviolet light
Biochem. Biophys. Res. Comm. 38, 3 (1970) 484-490

/171/ VARGHESE A.J.
Photochemistry of thymidine as a thin solid film
Photochem. Photobiol. 13 (1971) 357-364

/172/ VARGHESE A.J. and DAY R.S.
Excision of cytosine-thymine adduct from the DNA of ultraviolet-irradiated *Micrococcus radiodurans*
Photochem. Photobiol. 11 (1970) 511-517

/173/ VARGHESE A.J. and PATRICK M.H.
Cytosine derived heteroadduct formation in ultraviolet-irradiated DNA
Nature 223 (1969) 299-300

/174/ VIALETTES H.
La dosimétrie des rayonnements à l'aide du sulfate ferreux. Principes et synthèse des différents résultats
Note C.E.A. n° 534 (1965)

/175/ WACKER A., DELLWEG H. et JACHERTS D.
Thymin-dimerisierung und überlebensrate ber der bakterien
J. Mol. Biol. 4 (1962) 410-412

/176/ WARD J.F.
Mechanisms of radiation-induced strand break formation in DNA
Israel Journal of Chemistry 10 (1972) 1123-1138

/177/ WEISS J.
Les peroxydes organiques en radiobiologie
"Actions chimiques et biologiques des radiations" (Haissinsky Ed.)
Masson et Cie 4e Série (1958) p. 44

/178/ WEISS J.
Chemical effects of ionizing radiations on nucleic acids and related compounds
Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 3 (1964) 103-144

/179/ WIERZCHOWSKI K.L. and SHUGAR D.
Photochem. Photobiol. 1 (1962) p. 21

/180/ WYARD S.J. and ELLIOTT J.P.
ESR studies of radiation damage in nucleic acids, bases, nucleosides and nucleotides
Annals of New-York Acad. Sc. 222 (1973) 628-639

VU

Grenoble, le 21 Novembre 1974

Le Président de la thèse

VU, et permis d'imprimer,

Grenoble, le

Le Président de l'Université
Scientifique et Médicale